

博士学位論文

プチヴェールに含まれる
機能性成分の解析

2015年1月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

小瀬木 一真

略語表

- HPLC : High-performance liquid chromatography
- DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
- Tris : [Tris(hydroxymethyl)aminomethane]
- DCP : 2,6-Dichlorophenolindo-phenol sodium
- DNP : 2,4-Dinitrophenylhydrazine
- ODS : Octadecylsilyl
- TFA : Trifluoroacetic acid
- RBL-2H3 cell : Rat basophilic leukemia 2H3 cell
- MEM : Minimum essential medium
- FBS : Fetal bovine serum
- HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
- BSA : Bovine serum albumin
- OVA : Ovalbumin
- PBS : Phosphate buffered saline
- TNP : Trinitrophenol
- IgE : Immunoglobulin E

目次

第一章 序論.....	1
第二章 プチヴェール、ケール、メキャベツに含まれる抗酸化成分の解析	
目的	3
材料および方法	3
結果および考察	7
図表	10
第三章 調理操作がプチヴェールの抗酸化活性に与える影響	
目的	16
材料および方法	16
結果および考察	18
図表	21
第四章 加工過程がプチヴェールの抗酸化活性に与える影響	
目的	25
(A) 発酵実験	
材料および方法	25
結果および考察	28
図表	30
(B) 保温実験	
材料および方法	33
結果および考察	35

図表	36
(C) 乾燥粉末の分析	
材料および方法	39
結果および考察	40
図表	43
第五章 プチヴェールの機能性（抗アレルギー作用）の解析	
目的	48
(A) 細胞実験	
材料および方法	48
結果および考察	50
図表	53
(B) 動物実験	
材料および方法	56
結果および考察	57
図表	59
第六章 総合考察	63
参考文献	67
謝辞	71

第一章 序論

近年、悪性新生物、虚血性心疾患、脳血管疾患、糖尿病、高血圧性疾患などの生活習慣病は、死因別死亡割合では全体の約 6 割¹⁾、傷病分類別医科診療医療費では全体の約 3 割²⁾を占めるまでに至り、大きな社会問題となっている。これらの疾患には生活習慣、特に食習慣が大きく関わっており³⁾、適切な食品の摂取によって、その発症や進行を予防できると考えられている。食品は様々な機能性成分を有しており、我々の健康に寄与している⁴⁾ことから、これらの成分を含む機能性食品の研究は現在、世界的に注目を集めている⁵⁾。機能性成分を含有する食品としては、野菜や果実があげられる。これらの作物は、ビタミン類、ミネラル類、ポリフェノール類などの機能性成分が豊富に含まれる。特にポリフェノール類は様々な機能性をもつ成分として、抗酸化機構、免疫機構、脂質代謝機構、コレステロール代謝機構等に影響を及ぼすことが知られている^{6,7)}。我々は日常的に様々な種類の野菜を摂取しているが、その中でもケールを代表とするアブラナ科植物はポリフェノール化合物を多く含有している⁸⁾。ケールとメキャベツの交配によって生まれた新奇野菜プチヴェールは遺伝子組み換え技術を用いず、蜂や人の手による自然に近い交配方法で開発された野菜である。静岡県を中心に全国で栽培されており、収穫時期が 12~3 月の冬の野菜である。プチヴェールは親野菜のケールやメキャベツよりも、ビタミン C、鉄分、食物繊維の含有量が多く^{9,10)}栄養価は高い。また、親野菜のケールと同様、ポリフェノール化合物を多く含有する可能性が高い。

ポリフェノール化合物は電子あるいは水素ラジカルを供与できるフェノール性水酸基をもっており、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、脂質ペルオキシラジカルなどの酸素ラジカルを捕捉消去する¹¹⁾ため、ガンや動脈硬化の予防に役立つ成分と言われる。また、ケールやメキャベツに含まれているケルセチン、ケンフェロール、ルテオリンには抗アレルギー作用が認められる¹²⁾。プチヴェールの機能性については抗肥満効果¹³⁾の報告が 1 例あるのみで、その機能性についてはまだ明らかにされていない。さらに、プチヴェールの

調理特性について調べた例はない。近年徐々に普及し、市場に出まわりつつあるプチヴェールだが、生で食べられることはなく、調理を必要とする。その過程でプチヴェールの機能性成分が減少または変化している可能性がある。現在、プチヴェールおよびプチヴェール乾燥粉末を使用した酢、パン、麺などの加工食品が販売されているが、これらの加工食品に関しても、加工過程においてプチヴェールの機能性成分が減少または変化している可能性がある。

そこで本研究は、プチヴェールに含まれる機能性成分の解析を目的とし、機能性成分の量や組成、調理や加工が機能性成分に与える影響、機能性（抗アレルギー作用）を解析した。初めに、機能性成分の量や組成を解析するために、プチヴェールに含まれるラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミンC量の測定、HPLCによる成分の分離を行い、親野菜および標品と比較した（第二章）。次に、調理が機能性成分に与える影響を解析するために、茹で調理および電子レンジ調理したプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミンC量の測定、HPLCによる成分の分離を行い比較した（第三章）。さらに、加工がプチヴェールの機能性成分に与える影響を解析するために、プチヴェール酢製造過程のモデルとして発酵処理、さらなる加工食品への応用を模索するために保温処理を行い、ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミンC量の測定、HPLCによる成分の分離を行い比較した。また、乾燥粉末プチヴェールに対しても同様の解析を行った（第四章）。機能性の解析は、プチヴェールが抗アレルギー作用を有するか、細胞および動物実験による解析を実施した（第五章）。以上の結果に基づき、プチヴェールの機能性成分について考察した。

第二章 プチヴェール、ケール、メキャベツに含まれる抗酸化成分の解析

【目的】

プチヴェールは、親野菜であるケールやメキャベツと比較してビタミン C、鉄分、食物繊維の含有量が多く、栄養価が高い野菜である。また、プチヴェールの親野菜のケール、メキャベツは抗酸化成分を有しており、ガンや動脈硬化の予防に役立つ可能性があると考えられている。同様に、ケールとメキャベツの交配で生まれたプチヴェールも抗酸化成分を有し、ガンや動脈硬化の予防に寄与する可能性が期待できる。

本章では、プチヴェールの抗酸化成分に注目し、プチヴェールおよびケール、メキャベツのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定し、三種間での違いを比較、また、HPLC を用いて各野菜に含まれる成分の種類や量を測定し比較、検証を行った。

【材料および方法】

試料

プチヴェールとケールは JA あいち尾東から提供されたものを、メキャベツは日進市内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。購入直後、液体窒素により凍結させ、 -80°C で保存し、いずれも使用時に解凍して使用した。なお、試料は全て食用とする部分（プチヴェールとメキャベツは芽の部分、ケールは葉の部分）を分析に用いた。

抽出液の調製

星野らの方法¹⁴⁾を一部改変し、各試料 200g に 70%メタノール 500ml を加え、ワーリングブレンダー（7012S 型：大阪ケミカル）で粉碎、これをガーゼで濾し、濾液を遠心分離（4000rpm、10 分、 4°C 、MX-300：トミー工業）後、定性濾紙（No.2：ADVANTEC）で濾過し、濾液を約 50ml まで減圧濃縮（N-1000 型：東京理科器械）した。次いで、脂質を

除くために、80%メタノール 350ml、ヘキサン 400ml を加え液液分配抽出した。下層のメタノール層を、同量のヘキサンの再度液液分配抽出し、メタノール層を 20ml に減圧濃縮後、20ml にメスアップしたものを粗抽出液とした。この粗抽出液をダイヤイオン HP20 カラム (25mm×1000mm : 三菱化学) に供した。ダイヤイオン HP20 は多孔質構造を持たせた球状の合成吸着剤であり、樹脂内の細孔表面と被吸着物質間の物理的相互作用により溶液中から有機物を吸着することができる。粗抽出液中の有機物を樹脂に吸着させた後、水および 70%エタノールで溶出することで、親水性物質が多い画分と疎水性物質が多い画分に分けた。それぞれの画分を水溶出画分、70%エタノール溶出画分とし、各種解析に用いた。

HPLC による成分の分離では、それぞれの画分に含まれる物質の種類および量を三種間で比較するために、水溶出画分中の総ポリフェノール量を 55.7 μ mol/100g、70%エタノール溶出画分中の総ポリフェノール量を 31.6 μ mol/100g になるよう Milli-Q 水で希釈し、濾過 (DISMIC-25cs 0.45 μ m : ADVANTEC) した。これらを試料液とし、10 μ l を分析に用いた。

試薬

フェノール試薬は SIGMA-ALDRICH 社より購入し、その他の試薬は和光純薬株式会社より購入した特級および LC/MS 用試薬を用いた。

ラジカル捕捉活性の測定

Murakami らの方法¹⁵⁾を一部改変して DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。各抽出液を適宜希釈して 300 μ l 分取し、100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) 450 μ l を含む遮光したチューブに注入した。ここに 0.5mM DPPH 溶液 1.5ml を加えて攪拌し、25 $^{\circ}$ C で 20 分反応させた後、エタノールを 10ml 加えた。再度攪拌してから 517nm の吸光度 (UV-1200 : 島津製作所) を測定し、ラジカル捕捉活性を求めた。なお、ラジカル捕捉活性は Trolox 当量で示した。

総ポリフェノール量の測定

津志田らの方法¹⁶⁾を一部改変して総ポリフェノール量を測定した。各抽出液を適宜希釈して2ml分取し、ここに2倍希釈したフェノール試薬を2ml加えて攪拌した。3分後に10%炭酸ナトリウム溶液2mlを加えて攪拌した後、60分間反応させ、遠心分離(8500×g、10分、4℃)に供した。得られた上清の吸光度(750nm)を測定して総ポリフェノール量を求めた。なお、総ポリフェノール量はクロロゲン酸当量で示した。

総ビタミンC量の測定

ヒドラジン法を用いて定容した。各抽出液を適宜希釈して1ml分取し、5%メタリン酸に溶解後、50mlにしたものを試料溶液とした。試料溶液1mlを試験管に採取し、0.03%DCP溶液0.5ml、2%チオ尿素-5%メタリン酸溶液1ml、2%DNP-9N H₂SO₄溶液0.5mlを順次加えてよく混和した。ビー玉で試験管に蓋をし、100℃で15分間反応後、氷水中で冷却した。さらに、冷却状態で85%H₂SO₄を2.5ml加え、よく混和した。室温で30分放置後吸光度(520nm)を測定し、総ビタミンC量を求めた。標準物質にはL-アスコルビン酸を用い、還元型と酸化型のビタミンCの合計を総ビタミンC量として示した。

HPLCによる成分の分離

(1) 親野菜およびケルセチンとの比較

プチヴェールと親野菜の成分組成の比較とプチヴェール抽出液中にケルセチンが含まれているかどうかを検証するために、以下の測定条件で分析を行った。プチヴェールの親野菜であるケールはケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体を含有しており、プチヴェールもこれらのポリフェノール化合物を含有している可能性が考えられる。そのため、ケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体のUV最大吸収波長を参考に予備実験を行い、検出波長を決めた。また、親水性物質が多い画分および疎水性物質が多い画分の分析を行うため、グラジエントの条件はMilliQ水100%から始め、アセトニトリルの濃度を60%

まで上げた。アセトニトリルの濃度を 60%以上に上げてもピークが検出されなかったため、最終濃度を 60%とした。成分の分離には、HPLC (LC-10AD および LC-20AD:島津製作所)、カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた。各野菜の試料およびケルセチンの測定条件は、移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。ケルセチン標準溶液は、ケルセチン二水和物をエタノールに溶解したものをを用いた。ケルセチン二水和物はフナコシ株式会社より購入したものを実験に用いた。

(2) ケルセチン配糖体との比較

プチヴェール抽出液中にケルセチン配糖体が含まれているかどうか検証するため、以下の条件で分析を行った。検出波長は (1) と同様の理由で決めた。グラジエントの条件は既報¹⁷⁾を参考にし、ルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンを検出できる分析条件を探索した。プチヴェール粗抽出液およびルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンの測定条件は移動相を A 液 (0.05%TFA MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→2 分は B 液 3%、2→30 分は B 液が 3→35%、30→31 分は B 液が 35→50%となるように直線的に濃度勾配をかけ、31→33 分は B 液 50%、33→35 分は B 液が 50→3%となるように直線的に濃度勾配をかけ、35→45 分は B 液 3%で溶離した。流速は 1.0ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。ルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンはそれぞれ、メタノール、アセトニトリル、エタノールに溶解したものを標準溶液として用いた。ルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンはフナコシ株式会社より購入したものを実験に用いた。

統計処理

結果の値は平均±標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windows を用いて、

一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

【結果および考察】

プチヴェール抽出液のラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定し、親野菜であるケールやメキャベツと比較した (Fig.1)。その結果、各野菜の水溶出画分のラジカル捕捉活性は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、158、308、273 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) で、ケールと比較して、プチヴェールでは有意に高値を示した (Fig.1-A)。また、70%エタノール溶出画分のラジカル捕捉活性は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、234、121、91 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) で、ケールと比較して、プチヴェールでは有意に低値を示した (Fig.1-B)。各野菜の水溶出画分の総ポリフェノール量は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、80、142、122 ($\mu\text{mol クロロゲン酸当量}/100\text{g}$) で、ケール、メキャベツと比較して、プチヴェールでは有意差は見られなかった (Fig.1-C)。70%エタノール溶出画分の総ポリフェノール量は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、434、217、167 ($\mu\text{mol クロロゲン酸当量}/100\text{g}$) で、有意差は見られなかったが、ケールに多く含まれている傾向が見られた (Fig.1-D)。各野菜の水溶出画分の総ビタミン C 量は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、34.4、28.2、21.2 ($\text{mg}/100\text{g}$) で、ケールと比較してプチヴェールは有意に低値を示した (Fig.1-E)。70%エタノール溶出画分の総ビタミン C 量は、ケール、メキャベツ、プチヴェールがそれぞれ、1.7、1.5、1.7 ($\text{mg}/100\text{g}$) だ (Fig.1-F)。ポリフェノール化合物の一種であるフラボノイドは、植物の表皮細胞中に含まれ、紫外線遮断色素として植物を紫外線障害から保護する。また、フラボノイド含有量は植物種や光強度の違いに依存して変動すること¹⁸⁾が知られている。そのため、主に植物体の葉の部分を利用するケールでは、紫外線のストレスを受ける面積が大きいためポリフェノール化合物の含有量が多く、結球しているメキャベツや主に芽の部分を利用するプチヴェールは、紫外線のストレスを受ける面積が小さいため、ポ

リフェノール化合物の含有量が少なかったのではないかと考えられる。また、各野菜の70%エタノール溶出画分は、総ビタミンC量が僅か (Fig.1-F) にも関わらず、ラジカル捕捉活性を有していた (Fig.1-B)。70%エタノール溶出画分のラジカル捕捉活性と総ポリフェノール量を比較すると、両者ともケール、メキャベツ、プチヴェールの順に高い (Fig.1-B,D) ことから、これらのラジカル捕捉活性は総ポリフェノール量に由来していると考えられる (Fig.2)。一方、水溶出画分ではいずれの野菜も70%エタノール溶出画分よりも総ビタミンC量が多く (Fig.1-E)、総ポリフェノール量が少なかった (Fig.1-C)。さらに、水溶出画分のラジカル捕捉活性と総ビタミンC量を比較すると、総ビタミンC量が最も多いケールのラジカル捕捉活性が他の野菜よりも低かった (Fig.1-A,E)。そのため、メキャベツやプチヴェールはビタミンC以外の水溶性抗酸化物質を含有している可能性が考えられる。

次に、HPLCにより各野菜の成分を分離し比較した (Fig.3)。その結果、水溶出画分ではどの野菜も大きく分けて3.5分付近と4.3分付近にピークが検出された (Fig.3-A)。この2つのピークを比較すると、ケールは3.5分付近に検出されたピークの方が、4.3分付近に検出されたピークに比べて大きかったのに対して、プチヴェール、メキャベツは4.3分付近に検出されたピークの方が大きかった。よって、プチヴェールはケールよりもメキャベツに近い成分組成であると考えられる。また、プチヴェールの水溶出画分では、7分付近でピークが検出されたが、他の2野菜からは検出されなかった。そのため、プチヴェールは親野菜には含まれていない成分を含有している可能性が考えられる。また、70%エタノール溶出画分 (Fig.3-B) の結果では、どの野菜も30分から44分に複数のピークが検出され、それらの溶出時間は類似していた。しかし、ピークの大きさを比較すると、ケールは前半の30分から35分に検出されたピークが大きかったのに対して、プチヴェールとメキャベツは後半の40分から44分に検出されたピークが大きかった。よって、70%エタノール溶出画分に含まれる成分組成も、プチヴェールはメキャベツに近いと考えられる。

最後に、プチヴェール抽出液を標品と比較した。まず、プチヴェール70%エタノール溶

出画分とケルセチンを HPLC で分離し、検出ピークのパターンを比較した (Fig.4)。その結果、ケルセチンは 50 分付近にピークが現れたが、プチヴェール 70%エタノール溶出画分には相当するピークは見られなかった。よって、プチヴェール中にはケルセチンアグリコンは含まれていないことが分かった。次に、プチヴェール粗抽出液と配糖体型のポリフェノール化合物であるルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンを HPLC で分離し、検出されたピークのパターンを比較した (Fig.5)。その結果、ルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンはそれぞれ、24~25 分、25~26 分、27~28 分にピークが検出されたが、プチヴェール粗抽出液からは 25~26 分に小さなピークが検出されたものの、24~25 分、27~28 分にはピークは見られなかった。よって、プチヴェールにはルチン、ケルシトリンは含まれておらず、イソケルシトリンが含まれている可能性が考えられる。ただし、溶出時間の比較しか行っていないため、イソケルシトリンが実際に含まれているかを検証するためには、プチヴェール抽出液にイソケルシトリンを混ぜ、HPLC でピークの変化を解析する必要がある。

以上の結果から、ケール、メキャベツ、プチヴェールに含まれる抗酸化成分の量および組成について解析したところ、抗酸化物質の総量ではあまり差は見られなかったが、総ポリフェノール量では、プチヴェールはケールと比較して少なく、メキャベツに近い含有量を示した。さらに、ケールとの比較から、プチヴェールにはビタミン C 以外の抗酸化成分が含まれている可能性が考えられた。成分組成においても、プチヴェールはメキャベツに近かった。また、プチヴェールは他の 2 野菜には含まれていない成分を含有している可能性が示唆された。親野菜であるケールにはケルセチンやケルセチン配糖体が多く含まれているため、プチヴェールもそれらの物質を多く含んでいるのではないかと予測したが、標品との比較から、プチヴェールにはケルセチンアグリコンは含まれておらず、ケルセチン配糖体が含まれている可能性が考えられた。

第二章 图表

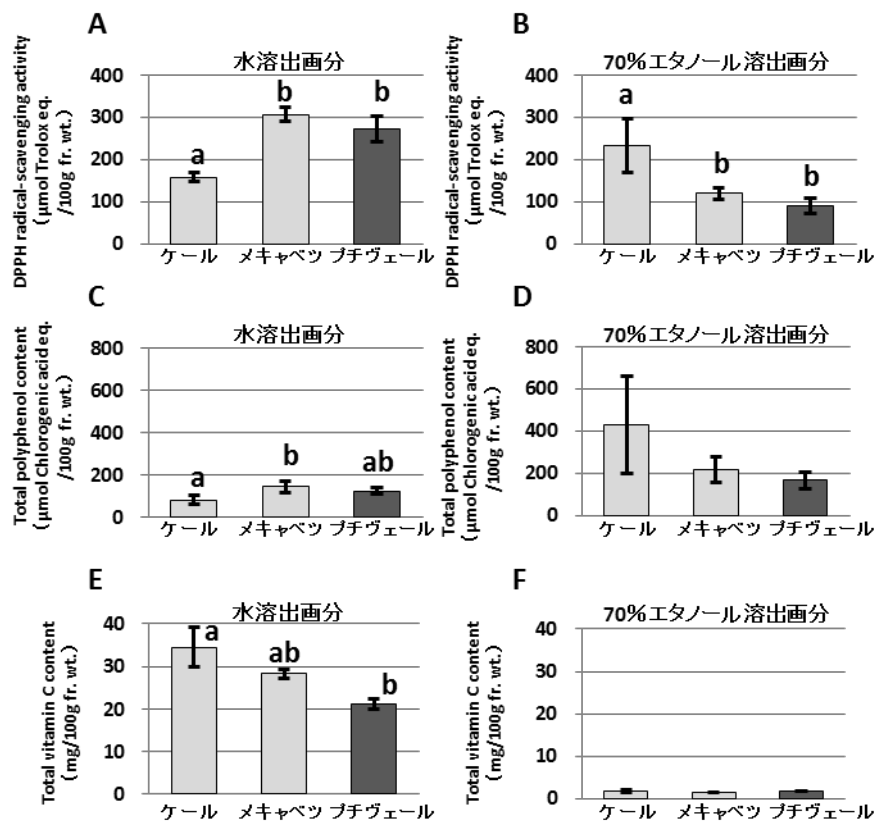


Fig.1 ケール、メキヤベツ、プチヴェールの水溶出画分および 70%エタノール溶出画分に含まれる DPPH ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量の比較

平均±標準偏差 (n=3)、異文字間に有意差あり

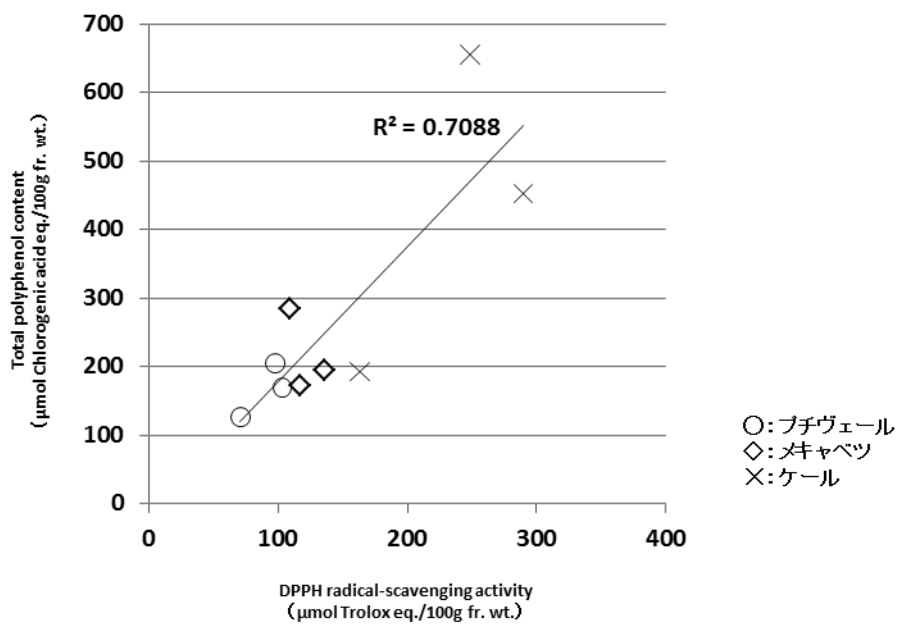


Fig.2 ケール、メキャベツ、プチヴェールの 70%エタノール溶出画分に含まれる DPPH
ラジカル捕捉活性と総ポリフェノール量の相関

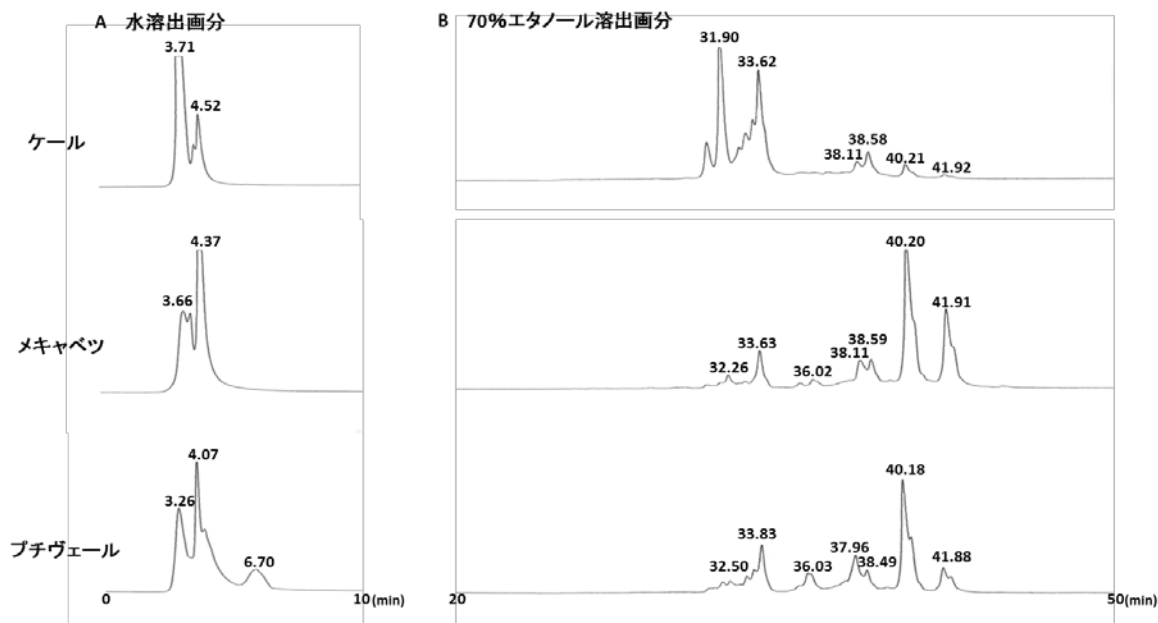


Fig.3 ケール、メキャベツ、プチヴェールの水溶出画分および70%エタノール溶出画分に含まれる成分の比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm：島津製作所) を用いた。移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。

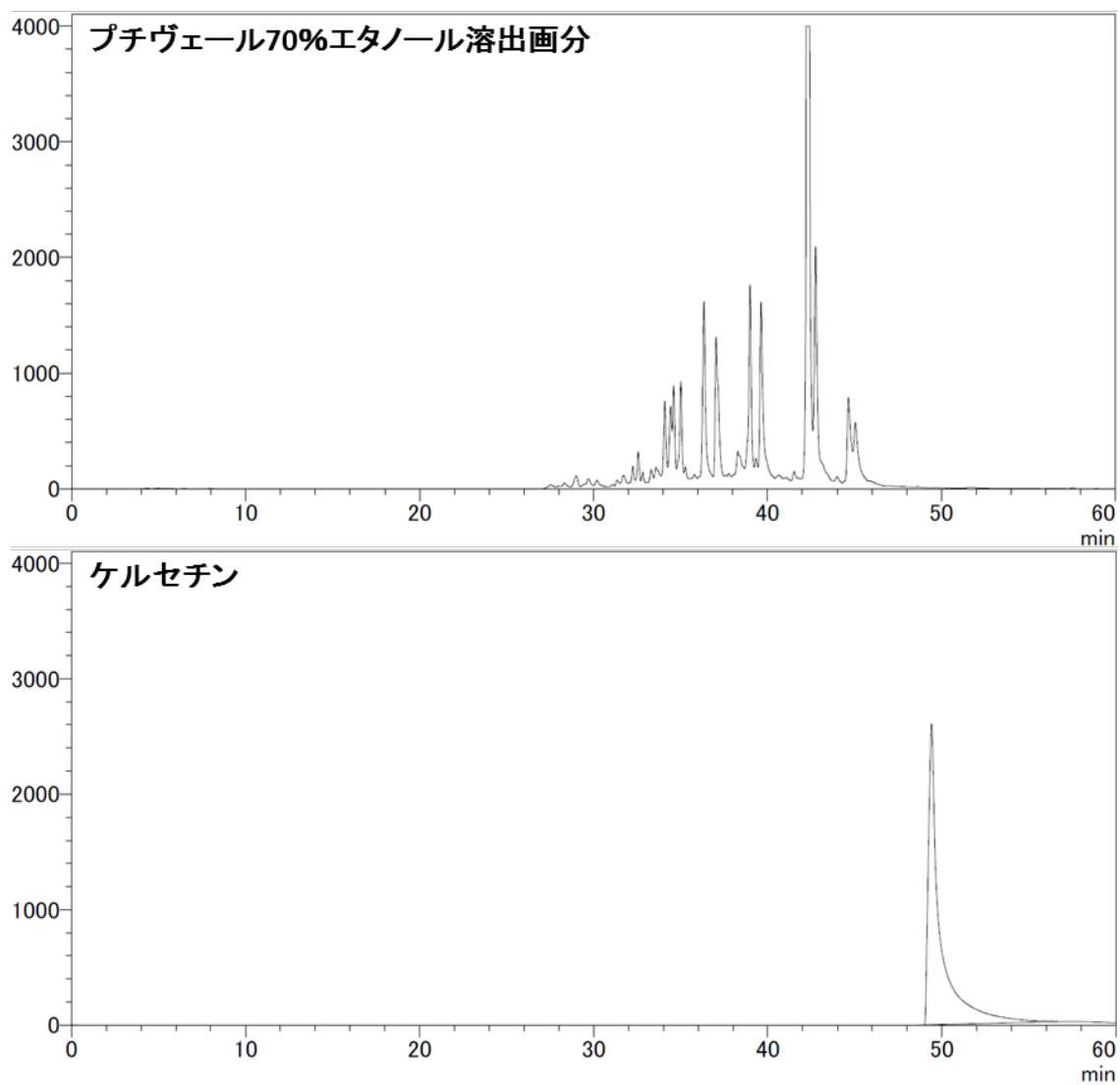


Fig.4 プチヴェール 70%エタノール溶出画分とケルセチンの比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm：島津製作所) を用いた。移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。

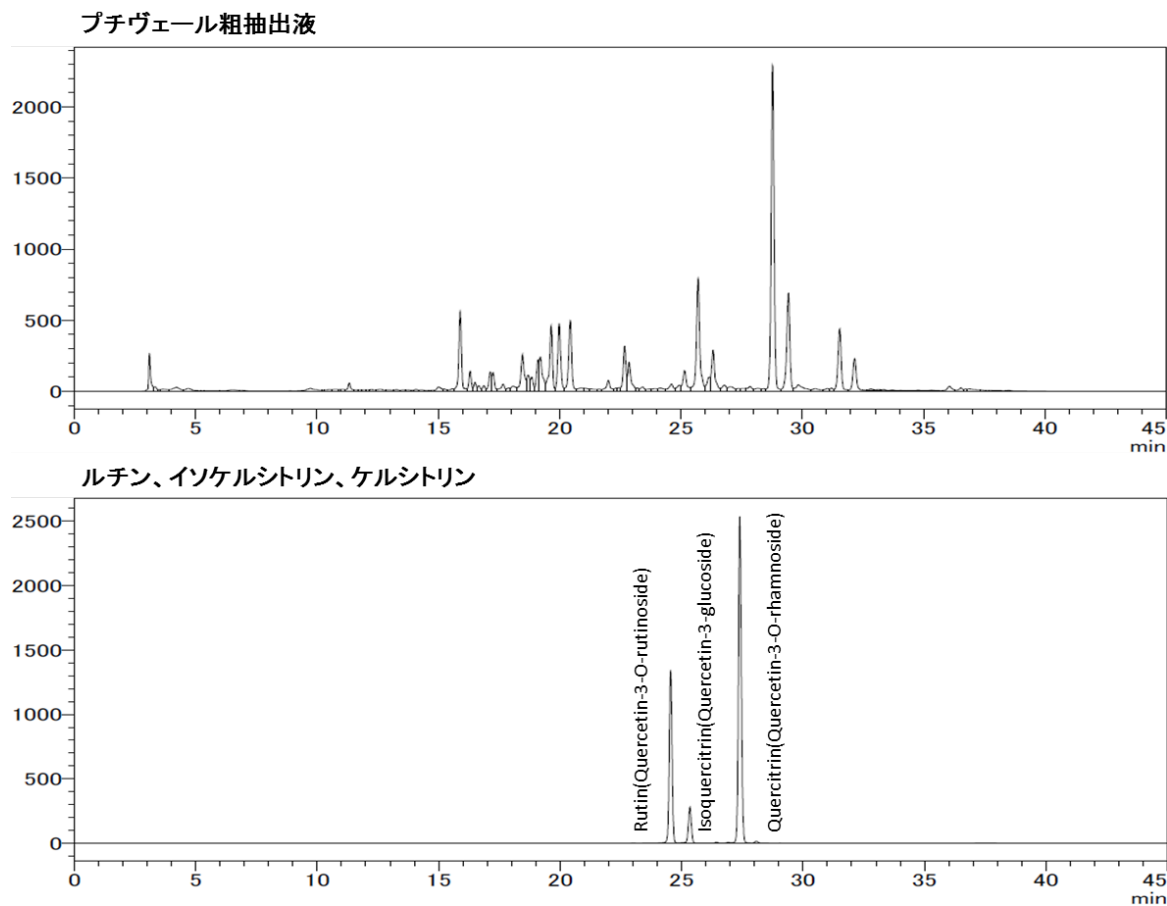


Fig5 プチヴェール粗抽出液とルチン、イソケルシトリン、ケルシトリンの比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた。移動相を A 液 (0.05%TFA MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラリエント条件は 0→2 分は B 液 3%、2→30 分は B 液が 3→35%、30→31 分は B 液が 35→50%となるように直線的に濃度勾配をかけ、31→33 分は B 液 50%、33→35 分は B 液が 50→3%となるように直線的に濃度勾配をかけ、35→45 分は B 液 3%で溶離した。流速は 1.0ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 350nm とした。

第三章 調理操作がプチヴェールの抗酸化活性に与える影響

【目的】

第二章で、プチヴェールはガンや動脈硬化の予防に役立つとされる抗酸化成分を含有していることを明らかにした。抗酸化成分の1つであるポリフェノール化合物は食品中で配糖体型と遊離型とが混在しており、水への溶解度などが異なる。プチヴェールは通常、生で食べられることはなく、茹でる、蒸す、焼くといった加熱調理を必要とする。その際、ビタミンの溶出や分解により、抗酸化活性が低下する可能性が考えられる。さらに、ポリフェノール化合物の組成にも影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、調理操作がプチヴェールの抗酸化活性に与える影響について調べた例はない。そこで本章では、調理によるプチヴェール中の機能性成分の消長を明らかにするため、各種調理後のプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミンC量を測定し、比較した。また、HPLCを用いて成分を分離し、含まれている成分の種類や量を測定し、比較、検証した。

【材料および方法】

試料

プチヴェールは第二章と同じく、JA あいち尾東から提供されたものを用いた。プチヴェールは液体窒素により凍結させ、 -80°C で保存し、使用時に解凍して使用した。

抽出液の調製

プチヴェール 200g を沸騰水道水中で3分もしくは10分茹でたもの、プチヴェール 200g をラップで包み、500W の電子レンジ (RE-S160-W : シャープ) で3分もしくは10分加熱したものに70%メタノール 500ml を加え、ワーリングブレンダーで粉碎、これをガーゼで濾し、濾液を遠心分離 (4000rpm、10分、 4°C) 後、定性濾紙 (No.2 : ADVANTEC) で濾過し、濾液を約50mlまで減圧濃縮した。次いで、脂質を除くために、80%メタノール350ml、

ヘキサン 400ml を加え液液分配抽出した。下層のメタノール層を、同量のヘキサンで再度液液分配抽出し、メタノール層を減圧濃縮後、20ml にメスアップしたものを粗抽出液とした。この粗抽出液を各種解析に用いた。

試薬

フェノール試薬は SIGMA-ALDRICH 社より購入、その他の試薬は和光純薬株式会社より購入した特級および LC/MS 用試薬を用いた。

ラジカル捕捉活性の測定

第二章のラジカル捕捉活性の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ポリフェノール量の測定

第二章の総ポリフェノール量の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ビタミン C 量の測定

第二章の総ビタミン C 量の測定と同様の方法を用いて測定した。

HPLC による成分の分離

調理操作がプチヴェールの成分組成へ与える影響を解析するために、以下の条件で分析を行った。第二章と同様の理由から、ケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体の UV 最大吸収波長を参考に予備実験を行い、検出波長を決めた。また、プチヴェール粗抽出液には親水性物質と疎水性物質が混在すると考えられるため、グラジエントの条件は MilliQ 水 100% から始め、アセトニトリルの濃度を 60% まで上げた。アセトニトリルの濃度を 60% 以上に上げててもピークが検出されなかったため、最終濃度を 60% とした。成分の分離には、HPLC (LC-10AD : 島津製作所)、カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津

製作所)を用いた。測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 350nm とした。

統計処理

結果の値は平均±標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windows を用いて、一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

【結果および考察】

調理方法の違いが成分の消長にどのように影響するかを明らかにするため、茹で調理および電子レンジ調理したプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定し、生のプチヴェールと比較した (Fig.6)。生プチヴェールのラジカル捕捉活性が 474 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) であるのに対して、茹で調理 3 分、茹で調理 10 分、電子レンジ調理 3 分、電子レンジ調理 10 分ではそれぞれ、138、51、311、298 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) で、生と比較して茹で調理では有意にラジカル捕捉活性が低く、11~29%に低下した。電子レンジ調理では有意差はないものの、ラジカル捕捉活性は低下傾向にあった (Fig.6-A)。生プチヴェールの総ポリフェノール量が 389 ($\mu\text{mol クロロゲン酸当量}/100\text{g}$) であるのに対して、茹で調理 3 分、茹で調理 10 分、電子レンジ調理 3 分、電子レンジ調理 10 分ではそれぞれ、119、40、365、341 ($\mu\text{mol クロロゲン酸当量}/100\text{g}$) で、生と比較して茹で調理では有意に総ポリフェノール量が低く、10~31%に低下した。しかし、電子レンジ調理では 88~94%の総ポリフェノール量が残存しており、有意差は見られなかった (Fig.6-B)。生プチヴェールの総ビタミン C 量が 88.4 ($\text{mg}/100\text{g}$) であるのに対して、茹で調理 3 分、茹で調理 10 分、電子レンジ調理 3 分、電子レンジ調理 10 分ではそれぞれ、38.1、

17.6、67.1、48.8 (mg/100g) で、生に対しどの調理後も有意に総ビタミン C 量が低く、茹で調理では 20~43%、電子レンジ調理では 55~76%が残存した (Fig.6-C)。これらの結果をまとめると、茹で調理ではラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量すべてが減少した (Fig.6-A,B,C)。そのため、茹で調理におけるラジカル捕捉活性の低下は、総ポリフェノール量と総ビタミン C 量の両方の減少に由来している可能性が考えられる (Fig.7)。本研究では茹で汁の成分を分析していないため断定はできないが、キャベツ、タマネギ、ブロッコリー、ホウレンソウ、タケノコ、ネギなどでは、茹で調理によってポリフェノール化合物などの抗酸化成分が茹で汁に溶出するとの報告¹⁹⁻²²⁾があることから、プチヴェールの茹で調理でも、抗酸化成分の溶出が起こっている可能性が考えられる。また、溶出ではなく分解が起こっている可能性も考えられるため、茹で汁も解析を行う必要がある。一方、電子レンジ調理ではラジカル捕捉活性は 63~66%に低下したが、総ポリフェノール量に変化はなかった。電子レンジ調理は沸騰水に入れないので茹で汁が必要ないためポリフェノール化合物は溶出しないが、熱に弱いビタミン C などの抗酸化成分が分解されたと考えられる。本研究においては、いずれの調理法においても熱に弱い抗酸化成分であるビタミン C^{23,24)}が減少した。よって、ビタミン C が分解されたため、ラジカル捕捉活性も低下したと考えられる。

次に、茹で調理および電子レンジ調理したプチヴェールの抽出成分を HPLC で分離し、得られたクロマトグラムを比較した (Fig.8)。その結果、どの試料も 4 分付近と 30 分から 40 分にかけてピークが検出されたが、生と電子レンジ調理後の試料のクロマトグラムには大きな違いがなかったが、茹で調理後の試料のクロマトグラムはどのピークも小さくなっていた。特に、茹で調理 10 分の試料では検出ピークの数と分量ともに大幅な減少が見られたので、10 分間の茹で調理でプチヴェール中の成分がほとんど流出または分解してしまうと考えられた。茹で調理によってプチヴェール中の成分が流出したのか分解したのかを検証するためには、茹で汁の分析を行う必要がある。一方、電子レンジ調理では大幅なピークの減少は観察されなかったため、プチヴェールの機能性成分を摂取するためには、茹

で調理よりも電子レンジ調理が有効であると考えられた。また、電子レンジ調理では 42 分付近に生では見られなかったピークが検出された。これは、加熱によって生じた分解物や重合物ではないかと考えられる。プチヴェールの調理における特性をさらに明らかにするためには、今後他の野菜との比較を行う必要がある。

第三章 图表

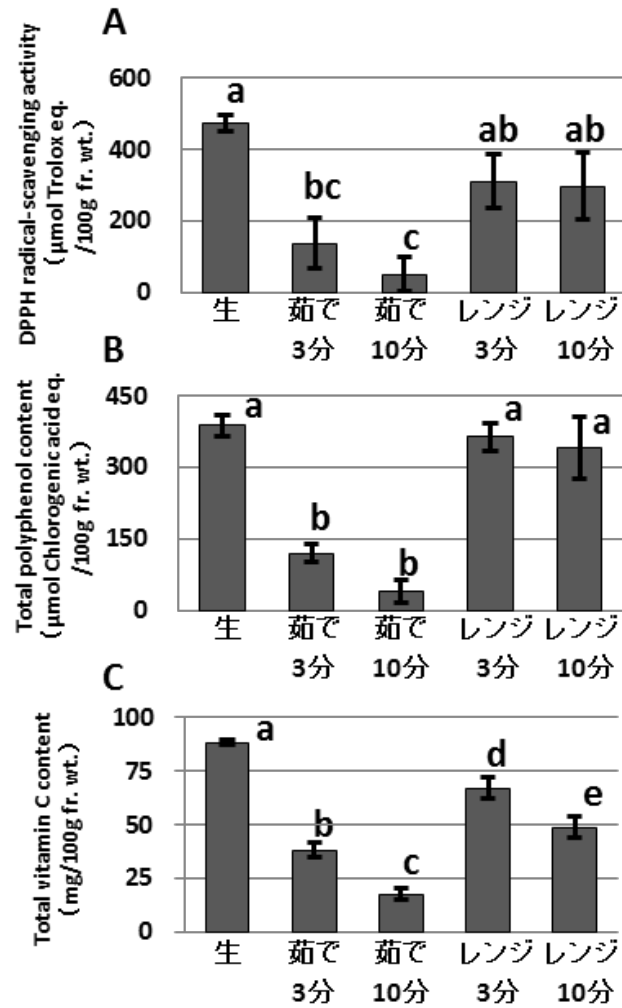


Fig.6 調理方法の違いによるプチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性、

総ポリフェノール量、総ビタミン C 量の比較

平均±標準偏差 (n=3)、異文字間に有意差あり。

茹で調理、電子レンジ調理後の値は調理前 100g に対するように示した。

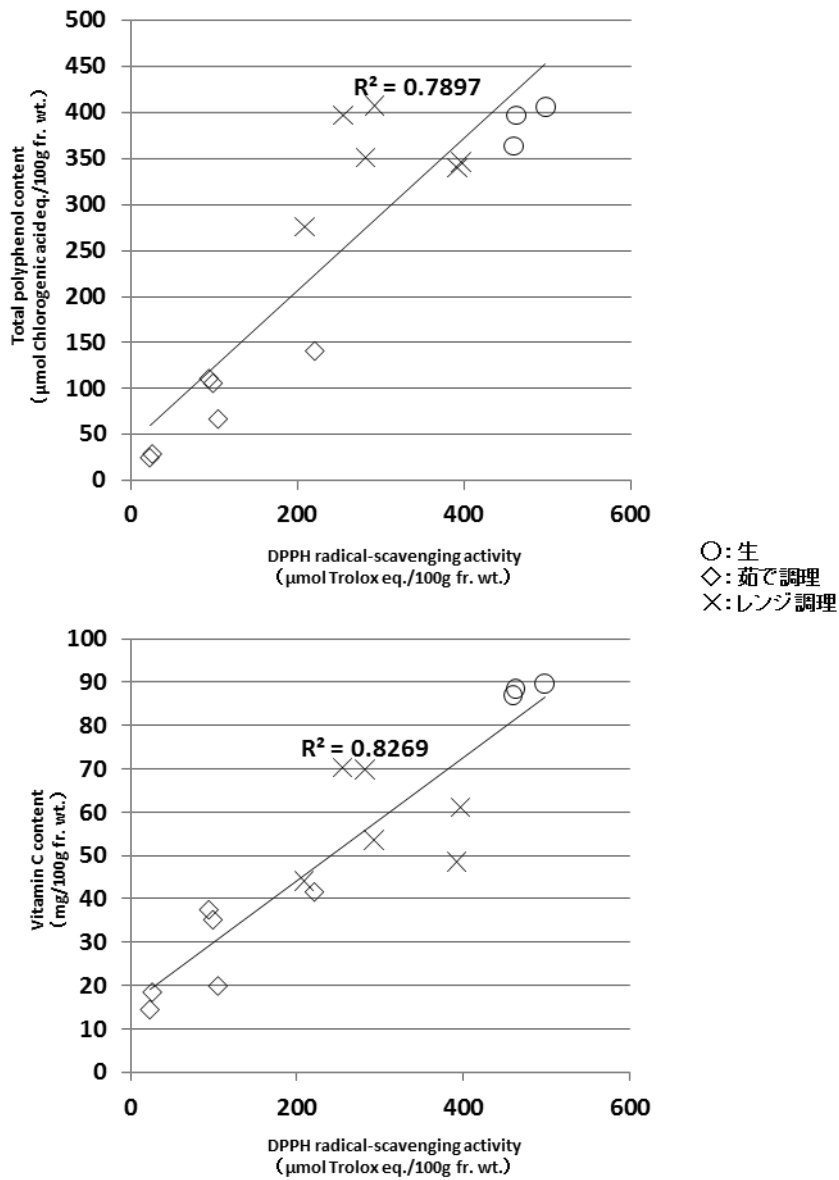


Fig.7 調理方法の違いによるプチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性と総ポリフェノール量および総ビタミン C 量の相関

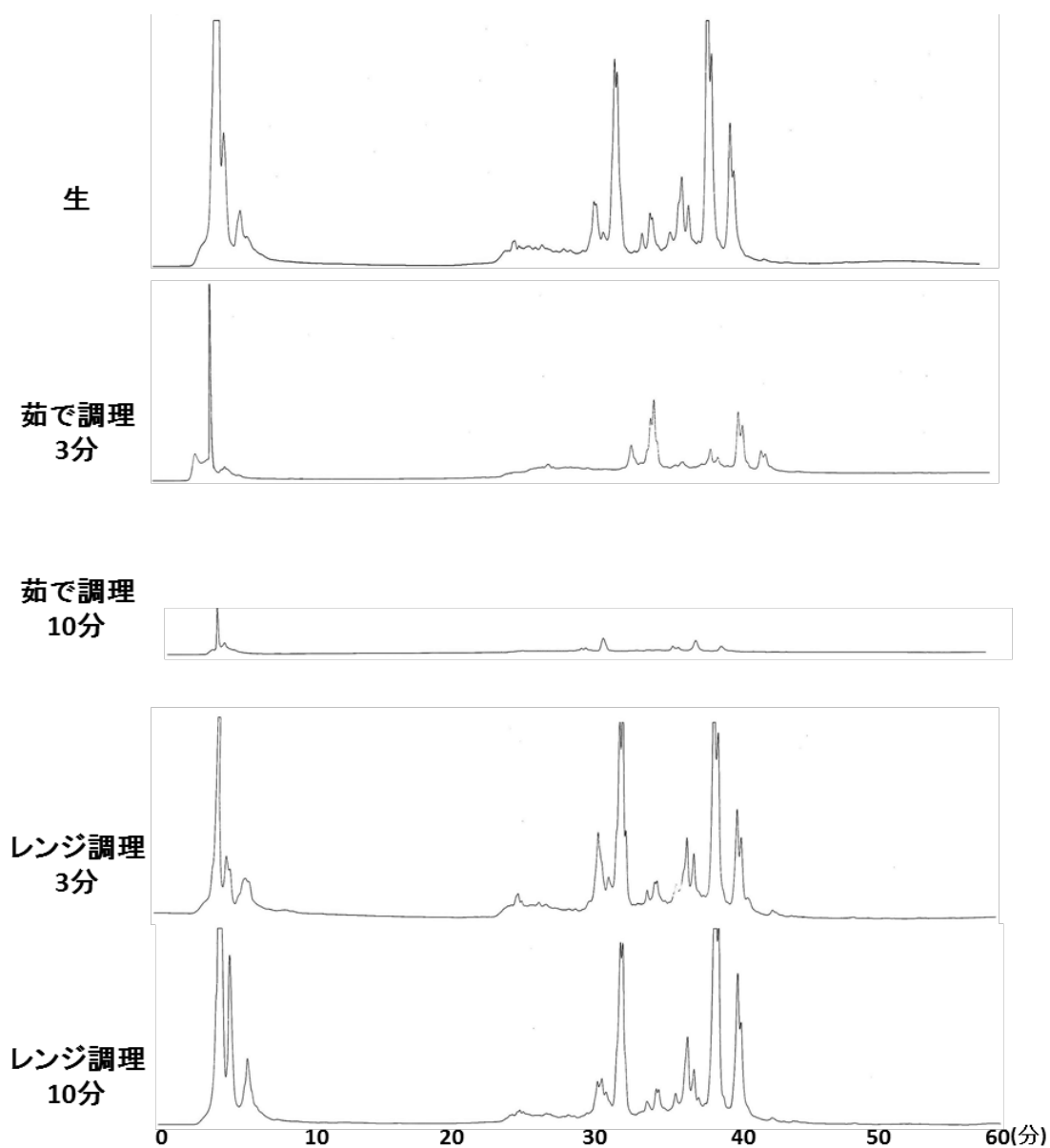


Fig.8 調理方法の違いによるプチヴェールの成分比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた。測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。

第四章 加工過程がプチヴェールの抗酸化活性に与える影響

【目的】

第二章の結果でプチヴェール中の成分はラジカル捕捉活性を有し、ポリフェノール化合物を含有していることを確認した。現在、プチヴェールは生鮮野菜としてだけでなく、加工食品として流通する製品もある。プチヴェールを発酵させたプチヴェール酢や乾燥粉末プチヴェールを練りこんだパンや麺がその一例である。プチヴェール酢はプチヴェール搾汁液にブドウ糖と酵母を加え発酵させ、さらに水と普通粕酢を加え二次発酵させた商品である。味噌や醤油などの発酵食品は発酵によって機能性が増大することが知られているため、プチヴェールも発酵によって機能性成分の量や組成が変化する可能性があると考えられる。また、乾燥粉末プチヴェールを練りこんだパンや麺も加熱調理工程で機能性成分の量や組成が変化する可能性がある。そこで、本章では加工工程がプチヴェールの機能性成分に与える影響について解析した。初めに、プチヴェール酢の加工モデルとして、発酵させたプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定し、HPLC を用いて各種成分を分離した（第四章 A）。次に、加熱操作を伴う新たな加工食品へのモデルとして、35℃で加熱したプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量を測定し HPLC を用いて各種成分を分離した（第四章 B）。加えて、乾燥粉末プチヴェールより種々条件で抽出された画分のラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量を測定し、HPLC を用いて各種成分を分離した（第四章 C）。

（A）発酵実験

【材料および方法】

試料

プチヴェールは第二章と同様、JA あいち尾東から提供されたものを用いた。液体窒素に

より凍結させ、 -80°C で保存、使用時に解凍して使用した。

抽出液の調製

プチヴェール酢としての利用を考え、酢酸発酵前のアルコール発酵におけるプチヴェールの抗酸化活性を評価するために、プチヴェール 150g に Elix 水 112.5ml を加え、ワーリングブレンダーで粉碎し、 100°C （沸騰水）中で 5 分加熱し殺菌した。殺菌後の粉碎液を 5 等分（52.5g）し、100ml 容のガラス瓶に入れ、グルコース 5g とドライイースト 0.5g を加えて 30°C の恒温槽に静置し 2、4、7 日間発酵させた。発酵前の粉碎液と発酵させた破碎液をそれぞれ 50ml チューブ 3 本に分注し、破碎液と同量の 100%メタノールを各チューブに加え、振盪機用低温恒温チャンバー（FMC-100 : EYELA）内に小型回転培養器（ROTATOR RT-50: TAITEC）を設置し、振盪させながら 4°C で 24 時間抽出を行い、遠心分離（ $10000\times\text{rpm}$ 、10 分、 4°C 、）し、上清を 50ml チューブに回収、 -20°C で保存した。沈殿物には上清と同量の 70%メタノールを加えて混合し、同様の方法で 4°C 、24 時間抽出した。この抽出の工程を 3 回繰り返した。上清を混ぜ合わせた後、濾過（Millex-SV $5.00\mu\text{m}$: MILLIPORE）し、濾液を約 50ml に減圧濃縮した。次いで、脂質を除くため、80%メタノール 52.5ml、ヘキサン 60ml を加え液液分配抽出した。下層のメタノール層を、同量のヘキサンで再度液液分配抽出した。このメタノール層を減圧濃縮し、30ml にメスアップしたものを以下の分析に用いた。

試薬

フェノール試薬は SIGMA-ALDRICH 社より購入、その他の試薬は和光純薬株式会社より購入した特級および LC/MS 用試薬を用いた。

ラジカル捕捉活性の測定

第二章のラジカル捕捉活性の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ポリフェノール量の測定

第二章の総ポリフェノール量の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ビタミンC量の測定

第二章の総ビタミンCの測定と同様の方法を用いて測定した。

HPLCによる成分の分離

発酵処理がプチヴェールの成分組成へ与える影響を解析するために、以下の条件で分析を行った。第二章と同様の理由から、ケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体のUV最大吸収波長を参考に予備実験を行った。第二章で用いた350nmの検出波長ではピークが繋がって検出されてしまったため、ピークが分かれて検出された280nmの検出波長を分析に用いた。また、プチヴェール破砕液には親水性物質と疎水性物質が混在すると考えられるため、グラジエントの条件はMilliQ水100%から始め、アセトニトリルの濃度を60%まで上げた。アセトニトリルの濃度を60%以上に上げてピークが検出されなかったため、最終濃度を60%とした。成分の分離には、HPLC (LC-20AD：島津製作所)、カラムはShim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm：島津製作所)を用いた。測定条件は移動相をA液 (MilliQ水) およびB液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は0→10分はA液100%、10→50分はB液が0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60分はB液60%で溶離した。流速は0.5ml/min、カラム温度は40℃、検出波長は280nmとした。

統計処理

結果の値は平均±標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windowsを用いて、一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

【結果および考察】

プチヴェール破砕液を2、4、7日間発酵させ破砕後抽出した成分のDPPHラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミンC量を測定、継時的な変化を調べた (Fig.9)。DPPHラジカル捕捉活性は、発酵前から発酵7日目まで変化は見られなかった (Fig.9-A) が、総ポリフェノール量は発酵前413 (μmol クロロゲン酸当量/100g) から発酵2日目に600 (μmol クロロゲン酸当量/100g) に増加、4日目および7日目に752 (μmol クロロゲン酸当量/100g) および767 (μmol クロロゲン酸当量/100g) に増加した (Fig.9-B)。一方、総ビタミンC量は発酵前の95 (mg/100g) から発酵2日目33 (mg/100g) に減少、4、7日後も変化はなかった (Fig.9-C)。総ポリフェノール量の増加は、プチヴェール中に含まれるポリフェノール化合物を生成する酵素の働きによる可能性が考えられる。プチヴェールの発酵産物より抗酸化成分を発酵前のものと同様に摂取できる可能性が示唆された。

次に、発酵前と発酵2、4、7日間発酵させ、破砕後抽出した成分をHPLCで分離し、得られたクロマトグラムを比較した (Fig.10)。発酵前では32分付近のピークが最も大きかった (Fig.10-C) が、発酵2、4、7日目のピークは小さく、14、21、24、27分付近に異なるピークが検出された (Fig.10-D,E,F)。また、発酵前では25分付近に検出されたピーク (Fig.10-C) が、発酵2、4、7日目では検出されなかった (Fig.10-D,E,F)。イースト+グルコースのみ混合液の発酵前 (Fig.10-A) からは、顕著なピークが検出されなかったが、発酵2日目 (Fig.10-B) には数個のピークが検出された。そのうち、28~50分の間にあらわれたピークはプチヴェール粉砕液の発酵2日目 (Fig.10-D) のクロマトグラムのピークと重なっていた。また、イースト+グルコースのみ混合液の発酵2日目 (Fig.10-B) の6から21分にかけてのピークのうち、6分、21分付近のピークはプチヴェール粉砕液の発酵2日目 (Fig.10-D) と重なっていたが、大きさはかなり小さく、さらにその他のピークは重なっていなかった。また、14、21、27分付近のピークは発酵2日から4日目にかけて、24分付近の成分は発酵2日から7日目にかけてピークが大きくなっていた。今回の結果から、

発酵によるピークの変化は見られたが、新たな成分が生成しているかどうかは分からなかった。

第四章 A 図表

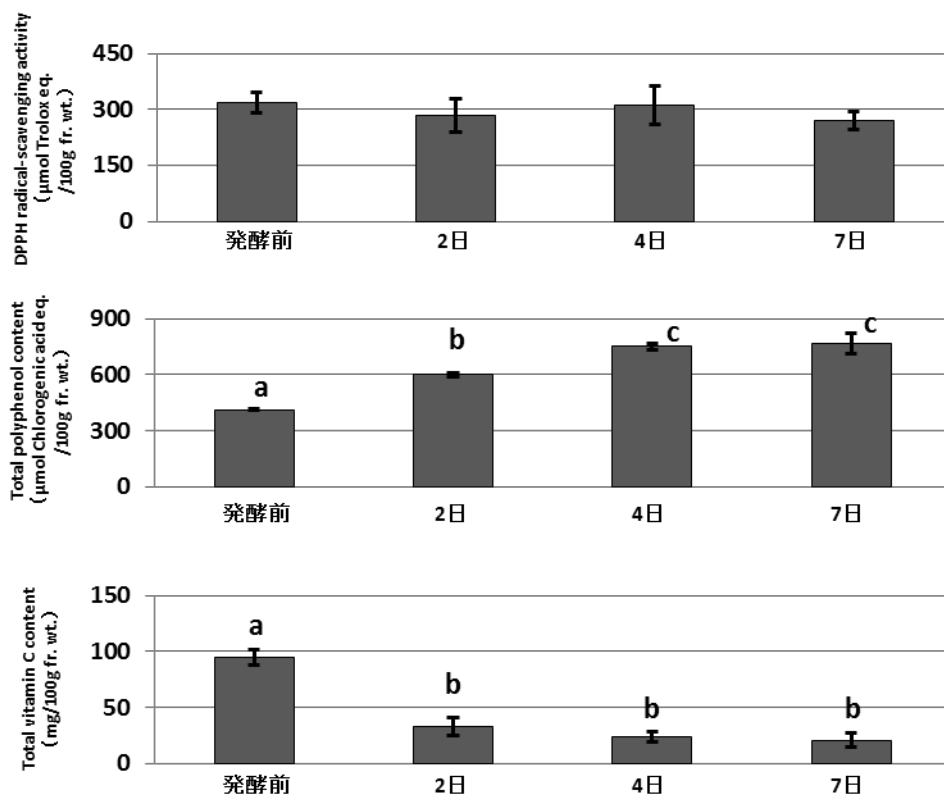


Fig.9 発酵によるプチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性、

総ポリフェノール量、総ビタミン C 量の変化

平均±標準偏差 (n=3)、異文字間に有意差あり

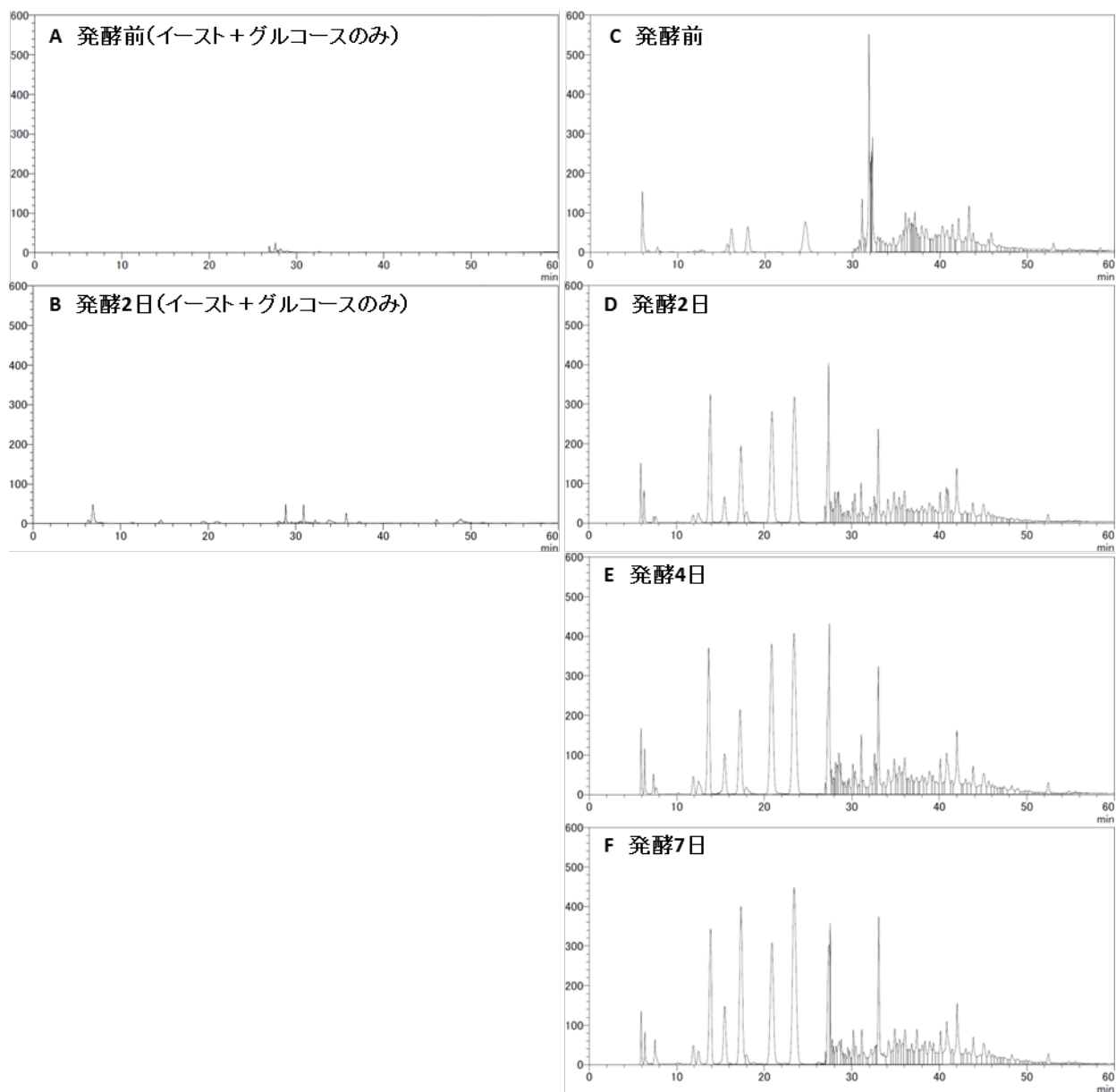


Fig.10 発酵による*ピチヴェール*の成分の変化

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた。測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60% となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60% で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 280nm とした。

(B) 保温実験

【材料および方法】

試料

プチヴェールは第二章と同様、JA あいち尾東から提供されたものを液体窒素により凍結させ、 -80°C で保存、使用時に解凍して使用した。

抽出液の調製

ポリフェノール化合物の生成には植物中の様々な酵素が関与しており、温度による影響を受ける可能性がある。プチヴェール破碎液中に酵素が存在していれば、保温により成分が変化するのではないかと考え、保温処理を行い、抽出液を作製した。プチヴェール 84g に Elix 水 63ml を加え、ワーリングブレンダーで粉碎した。粉碎液を 50ml チューブに 7 等分 (21g) し、 35°C の恒温槽でそれぞれ、0、5、10、30、60、120、240 分保温した。保温後はチューブを水中に入れ反応を止めた。破碎液と同量の 100%メタノールを各チューブに加え、振盪機用低温恒温チャンバー (FMC-100 : EYELA) 内に小型回転培養器 (ROTATOR RT-50 : TAITEC) を設置し、回転振盪させながら 4°C で 24 時間抽出を行い、遠心分離 ($10000\times\text{rpm}$ 、10 分、 4°C 、) し、上清を 50ml チューブに回収、 -20°C で保存した。沈殿物には上清と同量の 70%メタノールを加えて混合し、同様の方法で 4°C 、24 時間抽出した。この抽出の工程を 3 回繰り返した。上清を混ぜ合わせた後、濾過 (Millex-SV $5.00\mu\text{m}$: MILLIPORE) し、濾液を約 50ml に減圧濃縮した。次いで、脂質を除くため、80%メタノール 21ml、ヘキサン 24ml を加え液液分配抽出した。下層のメタノール層を、同量のヘキサンで再度液液分配抽出した。このメタノール層を減圧濃縮したものを 20ml にメスアップし、以下の分析に用いた。

試薬

フェノール試薬は SIGMA-ALDRICH 社より購入、その他の試薬は和光純薬株式会社より購入した特級および LC/MS 用試薬を用いた。

ラジカル捕捉活性の測定

第二章のラジカル捕捉活性の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ポリフェノール量の測定

第二章の総ポリフェノール量の測定と同様の方法を用いて測定した。

HPLC による成分の分離

保温処理がプチヴェールの成分組成へ与える影響を解析するために、以下の条件で分析を行った。第二章と同様の理由から、ケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体の UV 最大吸収波長を参考に予備実験を行い、検出波長を決めた。また、プチヴェール破碎液には親水性物質と疎水性物質が混在すると考えられるため、グラジエントの条件は MilliQ 水 100% から始め、アセトニトリルの濃度を 60% まで上げた。アセトニトリルの濃度を 60% 以上に上げててもピークが検出されなかったため、最終濃度を 60% とした。成分の分離には、HPLC (LC-20AD : 島津製作所)、カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた。測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が B 液 0%→60% となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60% で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 350nm とした。

統計処理

結果の値は平均±標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windows を用いて、一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統

計的に有意とした。

【結果および考察】

プチヴェール破砕液を 35°C の恒温槽で 0、5、10、30、60、120、240 分保温し、破砕後抽出した成分の DPPH ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量を測定し、継時的な変化を調べた (Fig.11)。DPPH ラジカル捕捉活性は、0 から 240 分まで差はなかった (Fig.11-A) が、総ポリフェノール量は、30 分から 240 分後に 422 (μmol クロロゲン酸当量/100g) から 509 (μmol クロロゲン酸当量/100g) に増加していった (Fig.11-B)。35°C 保温により DPPH ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量ともに減少しなかったため、35°C の加熱処理は機能性成分を失活させないと考えられた。

次に、0、5、10、30、60、120、240 分保温し、破砕後抽出した成分を HPLC で分離し、得られたクロマトグラムを比較した (Fig.12)。保温 0 分で最も大きかった 44 分付近のピークは、保温時間が長くなるにつれて徐々に小さくなった。また、40 分付近の 3 つのピークのうち、保温前は中央のピークが最も大きかったのに対し、保温時間が長くなるにつれて徐々に当該ピークが小さくなっていった。これらのことから、35°C の保温で当該ピーク成分の分解が起こっている可能性が考えられた。

以上の結果から、35°C でプチヴェール破砕液を保温したとき抗酸化活性や総ポリフェノール量は保持されると考えられるが、HPLC の結果から、保温がプチヴェールのいくつかの成分に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。35°C の保温ではプチヴェールの機能性は保持されたと考えられることから、プチヴェールは加工にも適す素材として期待される。

第四章 B 図表

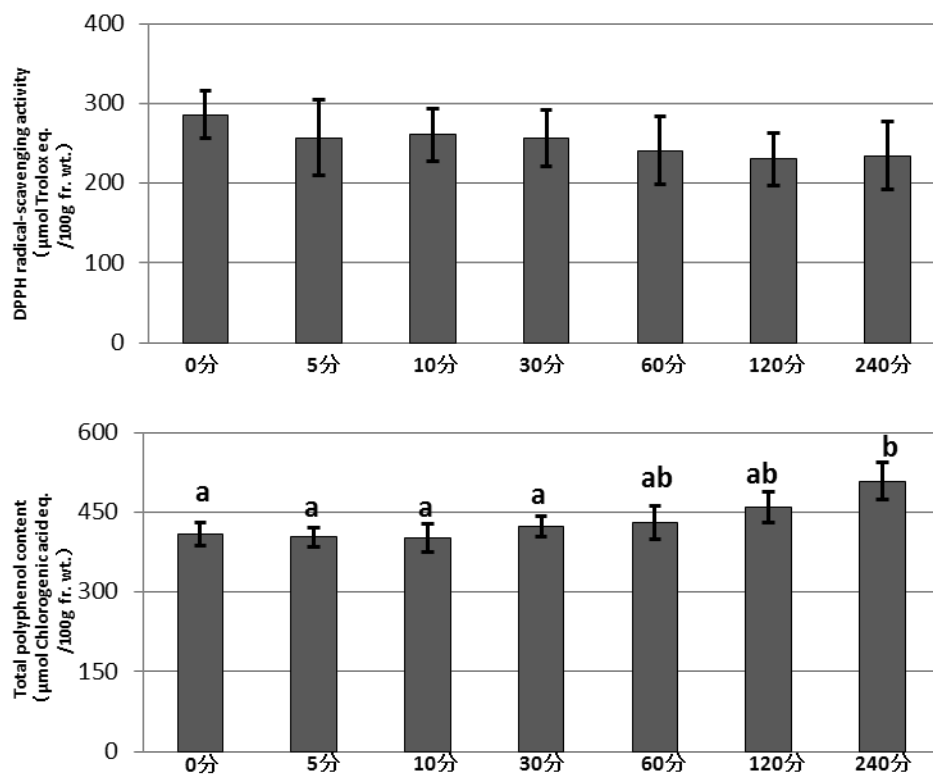


Fig.11 保温によるプチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性、

総ポリフェノール量の変化

平均±標準偏差 (n=3)、異文字間に有意差あり

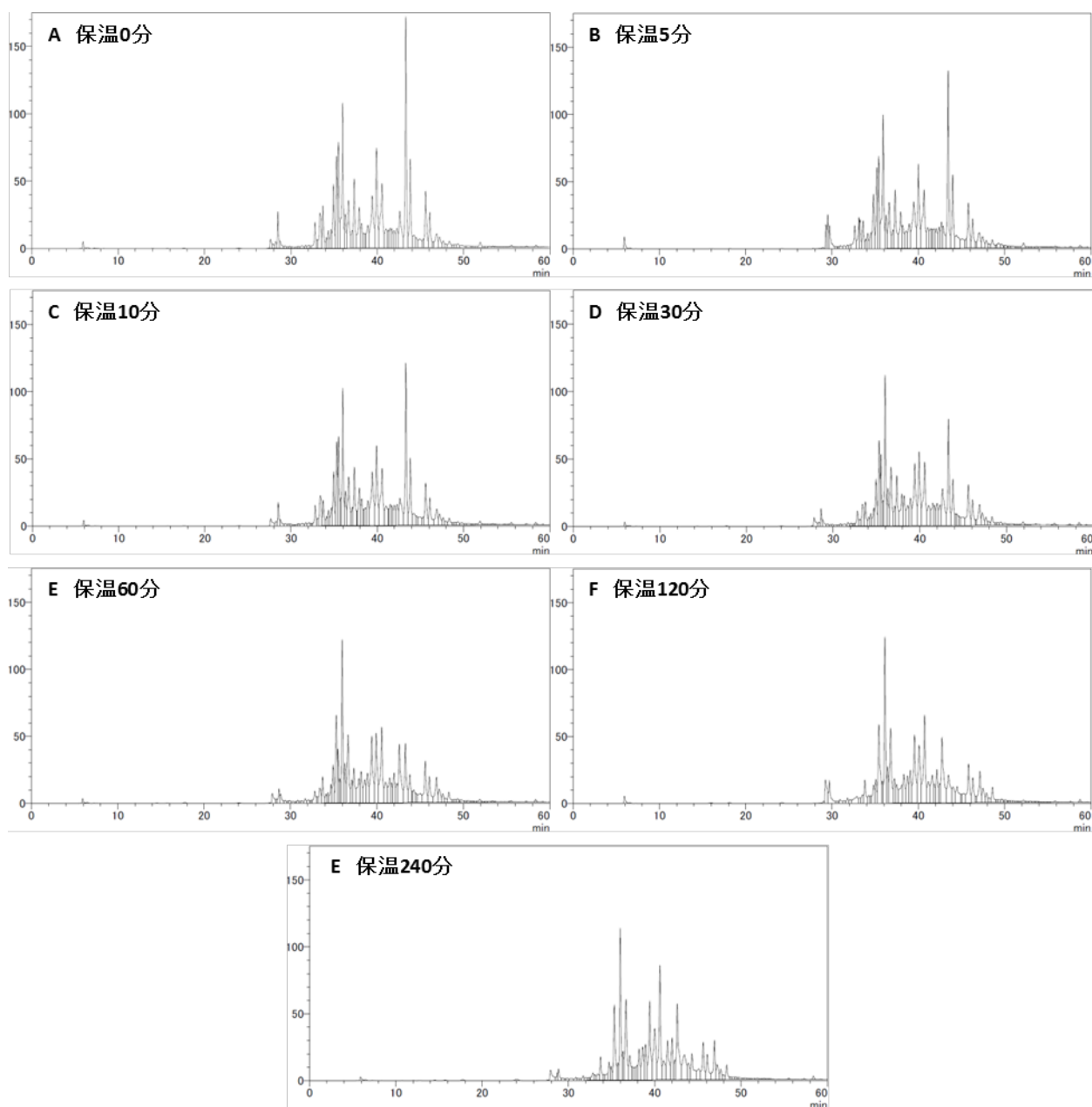


Fig.12 保温による*Pichia pastoris*の成分の変化

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm：島津製作所) を用いた。測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が B 液 0%→60% となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60% で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。

(C) 乾燥粉末プチヴェールの分析

【材料および方法】

試料

生プチヴェールは第二章と同様 JA あいち尾東から提供されたものを用い、液体窒素により凍結させ、 -80°C で保存した。乾燥粉末プチヴェール（八尋産業）は -20°C で保存した。いずれも使用時に解凍して使用した。

抽出液の調製

(1) 生と乾燥粉末プチヴェールの成分比較

プチヴェールは第三章に示した方法で粗抽出液を調製した。乾燥粉末プチヴェールは、試料 10g に 70%メタノール 500ml を加え、スターラーで 30 分攪拌した後、第二章に示した方法で粗抽出液を作製した。これらの粗抽出液を各種解析に用いた。

(2) 抽出条件の違いによる成分比較

乾燥粉末プチヴェール 10g に水 500ml を加え、30 分常温で攪拌した。1 つめはそのまま、2 つめは 60°C の恒温槽で (SD MINI : TAITEC) で 2 時間静置、3 つめは還流冷却器を用いて 100°C で 2 時間抽出、4 つめは 30 分の攪拌を 4°C のコールドルーム内で行い、 4°C の冷蔵庫 (MPR-312D (CN) : 三洋電機) で 18 時間静置したものとし、第三章の抽出液の作製と同じ手順で粗抽出液を作製した。これらの粗抽出液を各種解析に用いた。

試薬

フェノール試薬は SIGMA-ALDRICH 社より購入、その他の試薬は和光純薬株式会社より購入した特級および LC/MS 用試薬を用いた。

ラジカル捕捉活性の測定

第二章のラジカル捕捉活性の測定と同様の方法を用いて測定した。

総ポリフェノール量の測定

第二章の総ポリフェノール量の測定と同様の方法を用いて測定した。

HPLC による成分の分離

乾燥粉末プチヴェールおよび抽出条件の違いが乾燥粉末プチヴェールの成分組成へ与える影響を解析するために、以下の条件で分析を行った。第二章と同様の理由から、ケルセチンやケンフェロールおよびその配糖体の UV 最大吸収波長を参考に予備実験を行い、検出波長を決めた。また、プチヴェール粉末抽出液には親水性物質と疎水性物質が混在すると考えられるため、グラジエントの条件は MilliQ 水 100% から始め、アセトニトリルの濃度を 60% まで上げた。アセトニトリルの濃度を 60% 以上に上げててもピークが検出されなかったため、最終濃度を 60% とした。成分の分離には、HPLC (LC-10AD : 島津製作所)、カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた、測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60% となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60% で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40℃、検出波長は 350nm とした。

統計処理

結果の値は平均±標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windows を用いて、一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

【結果および考察】

(1) 生と乾燥粉末プチヴェールの成分比較

乾燥粉末プチヴェールと生プチヴェールの成分を比較、解析するため、ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量を測定した (Table.1)。生プチヴェールに含まれるラジカル捕捉活性は 474 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$)、乾燥粉末プチヴェールは 4315 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) だった。また、生プチヴェールに含まれる総ポリフェノール量は 489 ($\mu\text{mol クロロゲン酸 当量}/100\text{g}$)、乾燥粉末プチヴェールは 4649 ($\mu\text{mol クロロゲン酸 当量}/100\text{g}$) だった。本研究室で生プチヴェールを凍結乾燥させたところ、重量が 100g から 15.9g になった。これを元に生プチヴェールのデータを乾燥重量 100g あたりに換算すると、ラジカル捕捉活性は 2983 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$)、総ポリフェノール量は 2450 ($\mu\text{mol クロロゲン酸 当量}/100\text{g}$) となる。乾燥粉末プチヴェールは減圧平衡発熱乾燥法を用いているため単純に比較はできないが、乾燥重量で比較すると、乾燥粉末プチヴェールは生プチヴェールの約 1.4 倍のラジカル捕捉活性があり、約 1.9 倍のポリフェノールを含んでいた。生プチヴェールは通常食用とする芽の部分のみしか含まれていないが、乾燥粉末プチヴェールの原材料には芽に加えて外葉が含まれていたため、生プチヴェールよりもラジカル捕捉活性が高く、総ポリフェノール量も多かったと考えられた。これらのことから、乾燥粉末プチヴェールからも抗酸化成分やポリフェノール化合物を摂取できると考えられる。

次に、生と乾燥粉末プチヴェールの抽出成分を HPLC で分離し、得られたクロマトグラムを比較した (Fig.13)。どちらの試料も、4 分付近と 30 分から 40 分の間にピークが検出されたが、生では 6 分付近に検出されていたピークが、乾燥粉末には検出されなかった。また、34 分、39 分、40 分付近のピークが乾燥粉末ではなかった。さらに、31 分付近に生では検出されなかったピークが出現した。生と乾燥粉末は成分の量や組成に違いがあることが分かった。

現在、乾燥粉末プチヴェールを利用した食品にパンやうどんなどがある。このような食品を積極的に利用することで、機能性成分をより多く摂取することに繋がると考えられる。

(2) 抽出条件の違いによる成分比較

乾燥粉末プチヴェールを常温、4、60、100°Cで抽出した。各抽出液のラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量を測定し比較した (Fig.14)。ラジカル捕捉活性は、常温、4、60、100°C抽出で、2638、2598、2464、2575 ($\mu\text{mol Trolox 当量}/100\text{g}$) で、抽出温度の違いによる差は見られなかった (Fig.14-A)。総ポリフェノール量は、常温、4、60、100°C抽出で 4057、3770、3576、3458 ($\mu\text{mol クロロゲン酸当量}/100\text{g}$) で、常温抽出に対し、60、100°C抽出では有意に低下したが、それぞれ 88、85%の総ポリフェノール量が残存した。(Fig.14-B)。

次に、各抽出液の成分を HPLC で分離し、得られたクロマトグラム比較した (Fig.15)。いずれも 4 分付近と 30 分から 40 分にかけてピークが検出された。常温、4°Cおよび 60°C抽出では検出ピークの溶出時間に差はなかったが、34 分と 35 分のピークに注目すると、常温、4°C抽出では 34 分のピークの方が大きく、60°C抽出では 35 分のピークの方が大きかった。60°C抽出で僅かに成分の変化が起こっていることが示唆された。さらに、100°C抽出では、4 分付近と 30 から 40 分付近のピークが全体的に小さくなった。また、6 分付近に 100°C抽出でのみ検出されたピークがあった。100°C、2 時間の抽出により、成分の分解が起こったと考えられた。

以上のことより、60°C抽出、100°C抽出では総ポリフェノール量の減少が観察されたが、それぞれ常温抽出の 88%、85%にあたる総ポリフェノール量は残存した。さらに、HPLC による解析結果を見ても、100°C、2 時間の抽出でピークが小さくなっていた。総ポリフェノール量と HPLC の結果から、高温抽出はあまりよくないと考えられる。

第四章 C 図表

Table.1 生と乾燥粉末プチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性、
総ポリフェノール量の比較

	DPPHラジカル捕捉活性 ($\mu\text{mol Trolox eq./100g}$)	総ポリフェノール量 ($\mu\text{mol Chlorogenic acid eq./100g}$)
生プチヴェール	474 \pm 21	489 \pm 22
乾燥粉末プチヴェール	4315 \pm 131	4649 \pm 218

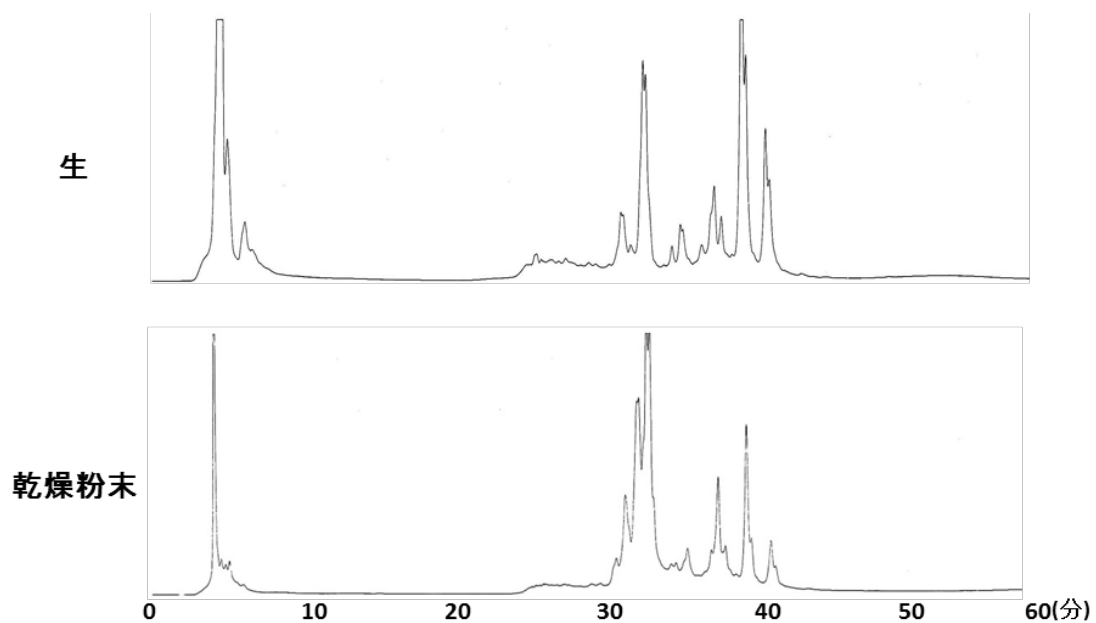


Fig.13 生と乾燥粉末プチヴェールの成分比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm : 島津製作所) を用いた、測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60% となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60% で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 350nm とした。

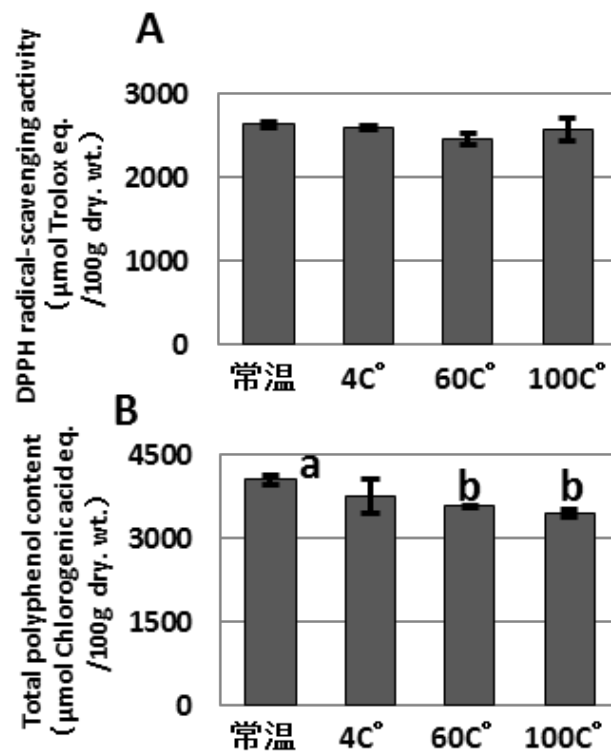


Fig.14 抽出条件の違いによる乾燥粉末プチヴェールの DPPH ラジカル捕捉活性、

総ポリフェノール量の比較

平均±標準偏差 (n=3)、異文字間に有意差あり

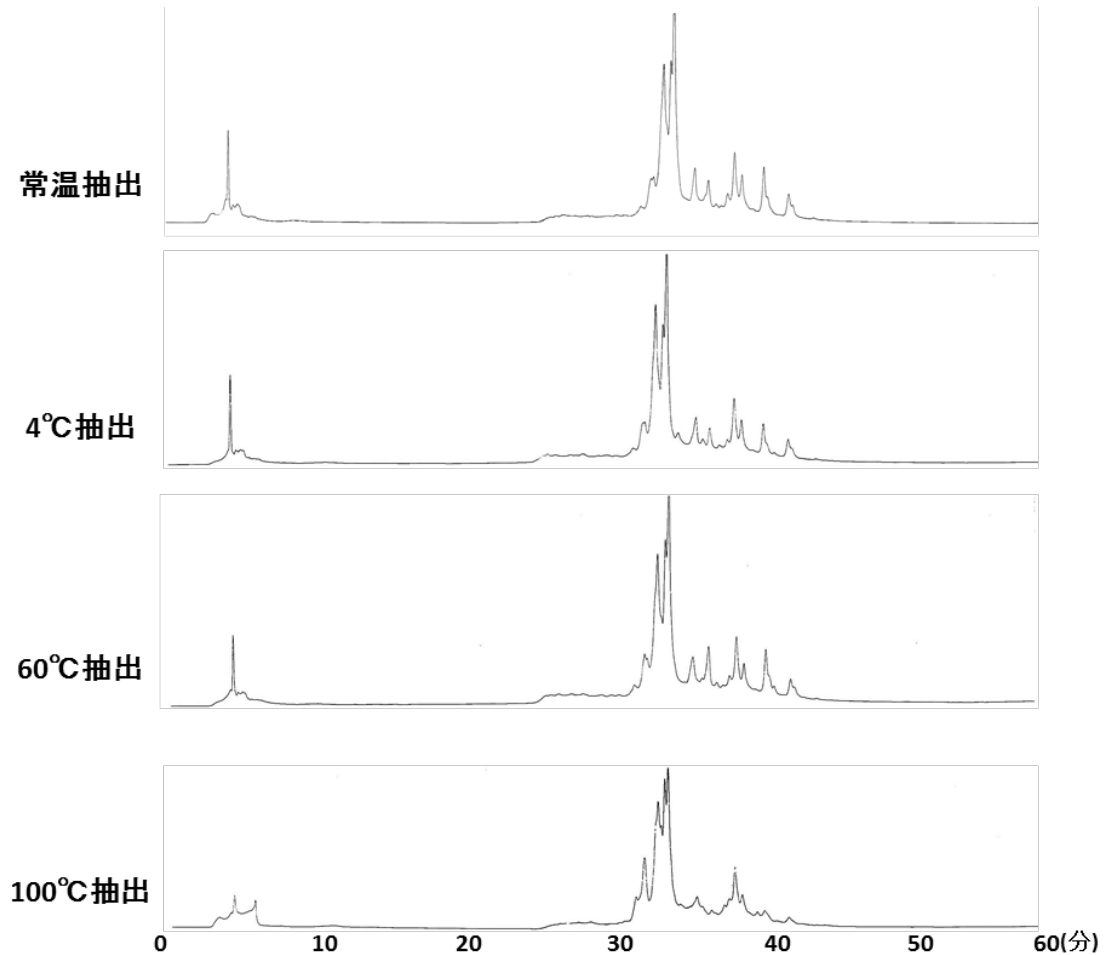


Fig.15 抽出条件の違いによるプチヴェール粉末成分の比較

カラムは Shim-pack VP-ODS (4.6mm I.D.×250mm：島津製作所) を用いた、測定条件は移動相を A 液 (MilliQ 水) および B 液 (アセトニトリル) とし、グラジエント条件は 0→10 分は A 液 100%、10→50 分は B 液が 0%→60%となるように直線的に濃度勾配をかけ、50→60 分は B 液 60%で溶離した。流速は 0.5ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 350nm とした。

第五章 プチヴェールの機能性（抗アレルギー作用）の解析

【目的】

プチヴェールの親野菜であるケールには、IgE を介した I 型アレルギー反応において、化学伝達物質を遊離し、炎症を誘導するマスト細胞からのヒスタミン放出を抑制する成分が含まれているという報告²⁵⁾があり、その有効成分として、ケルセチン、ケンフェロールなどのポリフェノール化合物があげられる²⁶⁾。第二章の結果より、プチヴェールにもポリフェノール化合物が含まれていることを確認したので、ケールと同様に抗アレルギー作用を有している可能性が期待できる。また、含有している成分の量や組成がケールとプチヴェールでは異なるため、抗アレルギー作用も異なる可能性も考えられる。近年、アレルギー性疾患患者数は増加を続けており、大きな社会問題となっている²⁷⁾。アレルギー性疾患による症状の予防、軽減、治療法などの開発が早急に望まれているが、医療費の増大から、医療品等の高額な治療法に頼ることなく、普段の食事による予防、軽減、治療法が求められている²⁸⁾。

そこで本章では、プチヴェールの抗アレルギー作用について解析した。抗アレルギー作用を評価する方法としては、ラット好塩基球性白血病細胞（以下 RBL-2H3 cell）を用いた、脱顆粒やヒスタミン放出の抑制作用を評価する方法が広く行われている^{14,27,29,30)}。この方法を用いて、RBL-2H3 cell にプチヴェール抽出濃縮液を添加し、脱顆粒の指標として β -hexosaminidase の量を測定することにより、脱顆粒抑制作用の有無等を検討し、ケールと比較した（第五章 A）。また、I 型アレルギーモデルマウスを用いて、プチヴェール抽出濃縮液の耳介浮腫抑制効果を検討した（第五章 B）。

（A）細胞実験

【材料および方法】

以下の実験材料を用いた。なお、購入先が特に記載されていないものについてはすべて和光純薬工業株式会社製造のものを用いた。

試料

第二章に示す方法で抽出したプチヴェール、ケールの水溶出画分、70%エタノール溶出画分を Tyrode's buffer で 2、4、8、16 倍に希釈したものを試料とした。

試薬

MEM 培地は SIGMA-ALDRICH 社より購入、10%ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン G カリウム (終濃度 100unit/ml : 明治製菓)、硫酸ストレプトマイシン (終濃度 100 μ g/ml : 明治製菓) を加えた。Tyrode's buffer は、NaCl (終濃度 130mM)、KCl (終濃度 5mM)、CaCl₂ (終濃度 1.4mM)、Glucose (終濃度 5.6mM)、HEPES (終濃度 10mM) を Milli-Q 水に溶解し、1M NaOH で pH7.4 に調整し濾過滅菌後、0.1%BSA を加えた。基質溶解溶液はクエン酸一水和物 (終濃度 1M)、クエン酸三ナトリウム二水和物 (終濃度 1M) をそれぞれ Milli-Q 水に溶解し、混合して pH4.5 に調整し、オートクレーブ (SX500 : トミー工業株式会社) にかけて、10 倍希釈した。反応停止液は Glycine (終濃度 0.2M) を Milli-Q 水に溶解して、NaOH (終濃度 3M 以上) で pH10.7 に調整した。基質溶液は 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (SIGMA-ALDRICH 社) を (終濃度 15mM) となるように、基質溶解溶液に溶解した。

細胞

細胞株はラット好塩基球形白血病細胞 (RBL-2H3 cell : 名古屋大学より分与) を用いた。

脱顆粒抑制作用の評価

RBL-2H3 cell を用いた脱顆粒アッセイについてフローチャートを示した (Fig.16)。96 ウ

エル細胞培養用マイクロテストプレート (FALCON) に RBL-2H3 cell を 1×10^5 cell/well で播種し、CO₂インキュベータ (MCO-18AIC : 三洋電機バイオメディカ) に入れ、37°C、5% CO₂の条件下で 5 時間培養した。細胞の接着を確認後、RBL-2H3 の細胞表面上に抗体を感作させるために、培地で 1000 倍希釈した Anti OVA mouse IgE 抗体を 50 μ l 添加し、37°C、5% CO₂の条件下で一晩培養した。1 ウェルあたり 300 μ l の Tyrode's buffer で 3 回洗浄後、Tyrode's buffer で希釈したプチヴェール各試料溶液を添加し、37°C、5%CO₂の条件下で 20 分置いた。ウェルの溶液を捨てた後、Tyrode's buffer で 1000 倍に希釈した Anti mouse IgE を 100 μ l 加えて 37°C、5%CO₂の条件下で 45 分間置き、脱顆粒を誘導した。なお、試料溶液を含まない Tyrode's buffer を添加し、同様に反応させたものをコントロール、Anti OVA mouse IgE 抗体を含まない培地で培養し、試料溶液を含まない Tyrode's buffer を添加して、同様に反応させたものをブランクとした。培養上清 20 μ l を別の 96 ウェルマイクロプレートに移し、50 μ l の基質溶液を加え、ユニット恒温槽 (THERMO MINDER SD mini : TAITEC) に入れ、37°C で 100 分間反応させた。反応停止液 150 μ l を加えた後、405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-650FA : コロナ電気) で測定した。 β -hexosaminidase の放出率 (脱顆粒率) は以下の式により求めた。

β -hexosaminidase 放出率 (脱顆粒率 : %) = (培養上清の吸光度 - ブランクの吸光度) / (コントロールの吸光度 - ブランクの吸光度) \times 100

【結果および考察】

プチヴェールおよびケールの水溶出画分と 70%エタノール溶出画分をそれぞれ、2、4、8、16 倍に希釈し、RBL-2H3 cell に添加、脱顆粒誘導後の上清の吸光度を測定、 β -hexosaminidase の放出率 (脱顆粒率) を計算したところ、コントロール (100%) に対し、プチヴェール水溶出画分を添加した場合の脱顆粒率は、2 倍希釈で 32.6%、4 倍希釈で 97% となり、脱顆粒が抑制された。その他の希釈倍率では抑制効果は観察されなかった (Fig.17-A)。一方、プチヴェール 70%エタノール溶出画分を添加した場合では、2 倍希釈

で 69.0%、4 倍希釈で 31.7%、8 倍希釈で 78.8%、16 倍希釈で 94.4%といずれの希釈倍率でも脱顆粒が抑制されたが、希釈倍率との相関はなかった (Fig.17-B)。

ケール水溶出画分では、脱顆粒率は、2 倍希釈で 55.6%、4 倍希釈で 35.1%となり、脱顆粒が抑制されたが、その他の希釈倍率では抑制効果は観察されなかった (Fig.17-C)。一方ケール 70%エタノール溶出画分では、どの希釈倍率でも脱顆粒は抑制されなかった (Fig.17-D)。

野菜や果物に含まれるいくつかのポリフェノール化合物には抗アレルギー作用があるという報告^{31,32)}がある。主にポリフェノール化合物を含んでいると考えられる 70%エタノール溶出画分で脱顆粒抑制作用が発揮されると予測したが、プチヴェールでは水溶出画分、70%エタノール溶出画分ともに脱顆粒抑制作用が見られた (Fig.17-A,B)。この結果から、RBL-2H3 の脱顆粒を抑制しているのは、一種類の成分ではなく、性質の異なる複数の成分が関与した可能性が考えられる。また、ホップ水抽出物にヒスタミンの放出を抑制する効果があり、その主要な成分はフラボノイド配糖体であった²⁶⁾ことから、プチヴェールには親水性を示すポリフェノール化合物、または配糖体型のポリフェノール化合物 (配糖体のため親水性を示す) が存在し、脱顆粒抑制に関わっている可能性も示唆される。

ケールについて同様の実験を行った結果では、水溶出画分で脱顆粒抑制作用が見られた (Fig.17-C) が、70%エタノール溶出画分では見られず (Fig.17-D)、プチヴェールとは異なる傾向を示した。これは第二章でも示したが、プチヴェールとケールは 70%エタノール溶出画分に違いが見られた。

本結果より、プチヴェールに RBL-2H3 cell の脱顆粒を抑制する成分が含まれていることは分かったが、その成分が何であるかは特定できなかった。しかし、プチヴェールの親野菜であるケール、メキャベツにはケンフェロールやケルセチンといったフラボノイドが含まれており⁸⁾、それらはヒスタミン遊離抑制作用があることが知られている²⁵⁾。また、メキャベツに含まれているルテオリンや近い品種であるキャベツに含まれているアピゲニン⁸⁾にもヒスタミン遊離抑制作用があることが知られている⁷⁾。第二章 B でプチヴェール

はケールと異なり、メキャベツに似たピークを検出したこと (Fig.3-A,B) から、ケールには含まれていないヒスタミン遊離抑制作用をもつポリフェノールを含んでいる可能性が考えられる。そのため、RBL-2H3 cell の脱顆粒抑制作用に違いがあったと推察される。また、プチヴェール水溶出画分において、7 分付近にケール、メキャベツとも異なるピークが見られた (Fig.3-A) が、このような特異的な成分が未知のポリフェノール化合物として脱顆粒抑制作用を発揮した可能性もある。脱顆粒を抑制することが明らかとなり、かつ、プチヴェールに特異的に含まれると思われるポリフェノール化合物を同定すること、さらに、新規のポリフェノール化合物を探索すること、また、その成分が脱顆粒を抑制するかどうかを明らかにすることなど、今後さらなる研究が必要である。なお、プチヴェール水溶出画分の 8、16 倍、ケール水溶出画分の 8、16 倍、ケール 70%エタノール溶出画分の 2、4、8、16 倍ではコントロールよりも脱顆粒が促進されているため、今後、細胞傷害性についても検討する必要がある。また、プチヴェール抽出液には脱顆粒を抑制する物質と促進する物質が混在している可能性あるため、プチヴェール抽出液をさらに精製して実験を行う必要がある。

第五章 A 図表

細胞の播種 : RBL-2H3 cell (1×10^5 cell)	50 μ l/well
↓ 37°C、5%CO ₂ 、5 h	
抗体の感作 : Anit - OVA mouse IgE (1000 倍希釈)	50 μ l/well
↓ 37°C、5%CO ₂ 、O/N	
Wash : Tyrode's buffer×3	300 μ l/well×3
↓	
試料溶液の添加	100 μ l/well
※試料溶液の希釈倍率	
(プチヴェール : 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍希釈)	
(ケール : 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍希釈)	
↓ 37°C、5%CO ₂ 、20min	
試料溶液除去	
↓	
脱顆粒の誘導 : Anti mouse IgE (1000 倍希釈)	
100 μ l/well	
↓ 37°C、5%CO ₂ 、45min	
上清を 96 ウェルマイクロプレートへ移す	20 μ l/well
↓	
基質 : 15mM 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide/基質溶解溶液	50 μ l/well
↓ 37°C、100min	
反応停止 : 0.2M Glycine (pH10.7)	150 μ l/well
↓	
吸光度測定 (405nm)	

Fig.16 RBL-2H3 cell を用いた脱顆粒アッセイ

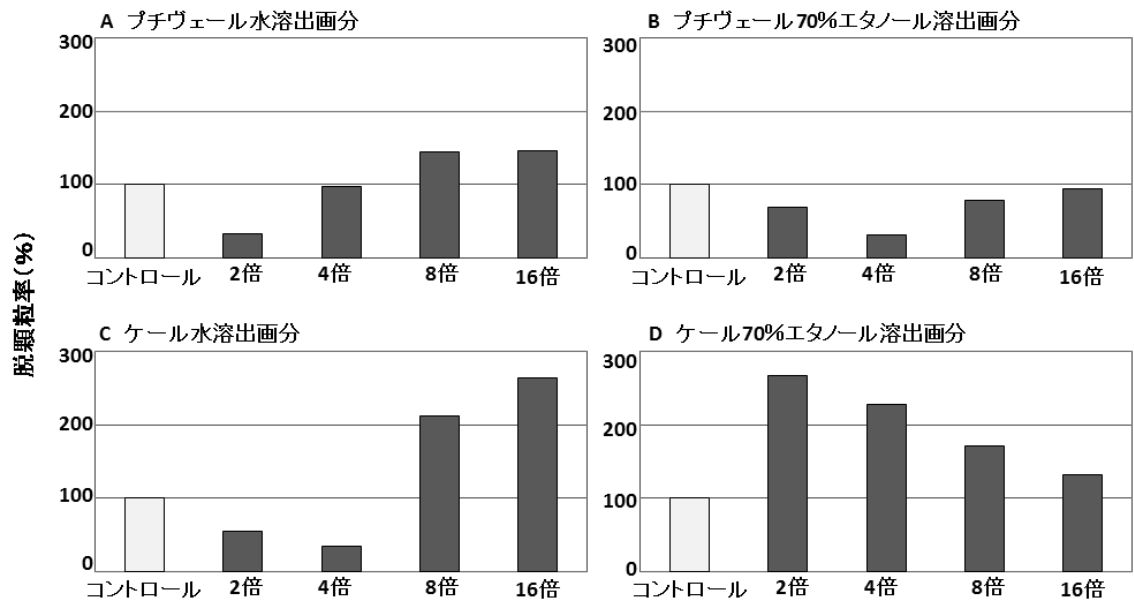


Fig.17 プチヴェールおよびケール抽出液添加による脱顆粒抑制作用の比較

プチヴェール水抽出画分、プチヴェール70%エタノール抽出画分、ケール水抽出画分、ケール70%エタノール抽出画分をそれぞれ2倍、4倍、8倍、16倍に希釈して添加した場合のRBL-2H3 cellからの β -ヘキソサミニダーゼ放出率（脱顆粒率）。 β -ヘキソサミニダーゼの放出率（脱顆粒率）はコントロールを100%として計算した。

(B) 動物実験

【材料および方法】

試料

第二章と同様の方法で抽出したプチヴェール粗抽出液のポリフェノール量を測定した後、0.1、1.0 (μmol クロロゲン酸当量/100 μl) となるように PBS で希釈した。

実験動物、飼料、飼育方法および検討方法

BALB/cCrSlc 雌マウス 21 匹（日本エスエルシーより購入）を 6 週齢で導入し、1 週間馴化させた。飼料は固形試料（CE-2：日本クレア）を与え、水は自由摂取とした。飼育環境は、明期 8-20 時、暗期 20-8 時、温度 24 $^{\circ}\text{C}$ とし、実験終了まで一定とした。実験は、名古屋学芸大学動物実験規定に従って行った。

実験スケジュールは Yamamoto らの方法³²⁾を参考にして行ったが、予備実験で耳の腫れが確認できなかった。そのため、経口投与の期間を 5 日間から 10 間に増やし、耳にアプライする抗原の濃度を 2 倍にした。しかし、1 度目の抗原のアプライでも耳の腫れが観察できなかったため、24 時間後に再度経口投与を行い、その 1 時間後に抗原を耳にアプライするという操作を加えた (Fig.18)。馴化後のマウスをコントロール群 5 匹、シプロヘプタジン群 5 匹、プチヴェール抽出液 0.1 μmol 投与群 5 匹、プチヴェール抽出液 1.0 μmol 投与群 6 匹の 4 群に分けた。コントロール群には PBS を 100 μl 、シプロヘプタジン群には 0.09% シプロヘプタジン (Cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate) in PBS 溶液 200 μl 、プチヴェール 0.1 μmol 抽出液投与群には 0.1 (μmol Trolox 当量/100 μl) に調製したプチヴェール抽出液 100 μl 、プチヴェール 1.0 μmol 抽出液投与群には 1.0 (μmol Trolox 当量/100 μl) に調製したプチヴェール抽出液 100 μl を 1 日 2 回、10 日間経口投与した。10 日目の投与後 1 時間後に、2 μg anti TNP IgE/0.1%BSA in PBS 溶液を 50 μl ずつ静脈注射し、マウスを感作状態にした。30 分後の耳の厚さ【before the challenge】をダイヤルシックネスゲージ (尾崎製作所)

で測定した。その後、抗原として1.6%塩化ピクリル（アセトンとオリーブオイル1:1に溶解した）溶液10 μ lを耳にアプライした。24時間後に再び各液を投与し、その1時間後にマウスの耳に再度抗原をアプライした。1時間後の耳の厚さ【after the challenge】を測定し、【before the challenge】と【after the challenge】の耳の厚さから、耳の腫れ率（%）を算出し、プチヴェール抽出液投与による抗アレルギー効果を解析した。

耳の腫れ率の計算方法：耳の腫れ率（%）＝【after the challenge】耳の厚さ（ $\times 10^{-2}$ mm）
／【before the challenge】耳の厚さ（ $\times 10^{-2}$ mm） $\times 100$

統計処理

結果の値は平均 \pm 標準偏差で示した。データの解析は、SPSS 21.0 for Windows を用いて、一元配置分散分析を行い、差が出た場合、Tukey 多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ のものを統計的に有意とした。

【結果および考察】

各群の【before the challenge】と【after the challenge】の耳の厚さから、耳の腫れ率を算出した（Fig.19）。その結果、PBSを投与したコントロール群は122%、シプロヘプタジン群は107%、プチヴェール抽出液0.1 μ mol投与群は113%、プチヴェール抽出液1.0 μ mol投与群は105%だった。コントロール群に対して、抗ヒスタミン薬であるシプロヘプタジンを投与した群、プチヴェール1.0 μ mol抽出液投与群は腫れが抑制された。プチヴェール抽出液を事前に摂取したことで、抗ヒスタミン薬と同様にアレルギー症状が抑制された。したがって、プチヴェール抽出液には抗原による抗体の架橋（Fig.20-①）や肥満細胞内のシグナル伝達を阻害する（Fig.20-②）物質が含まれる可能性に加えて、シプロヘプタジンと同様にヒスタミンのレセプターへの結合を阻害する（Fig.20-③）物質が含まれる可能性もある。

しかし、その成分が何であるかは特定できていない。プチヴェールに含まれている成分

が、複合的に作用している可能性もあり、今後プチヴェールの成分を分画分離し、同様の実験を行う必要がある。

第五章 B 図表

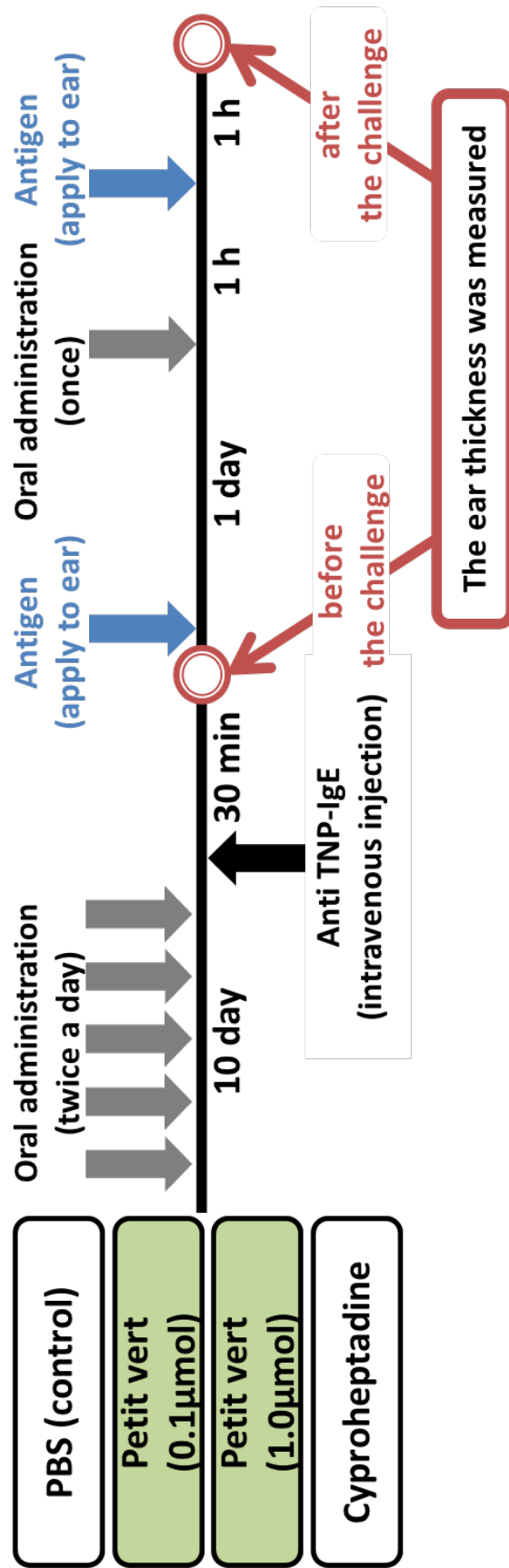


Fig.18 実験スケジュール

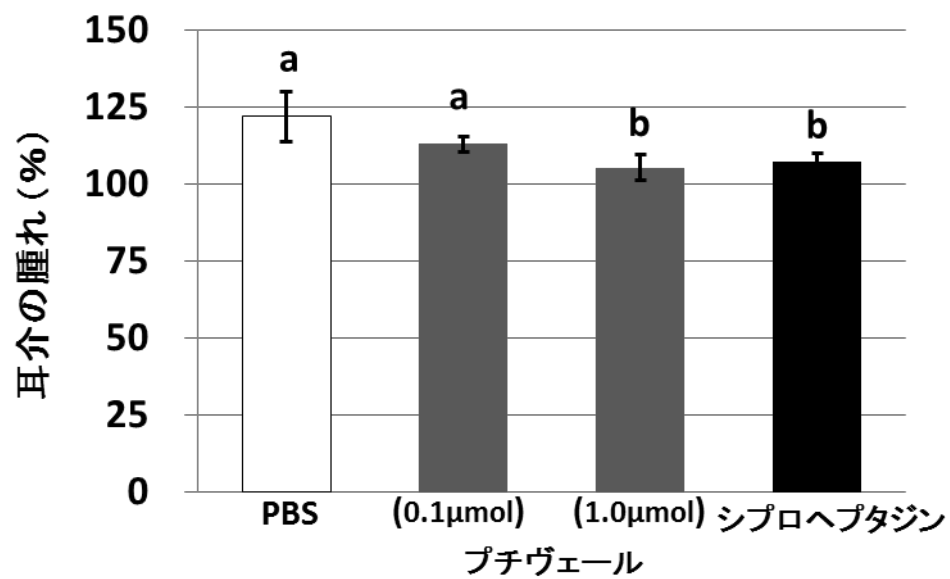


Fig.19 プチヴェール抽出物の耳介浮腫抑制効果

平均±標準偏差 (n=4~6)、異文字間に有意差あり

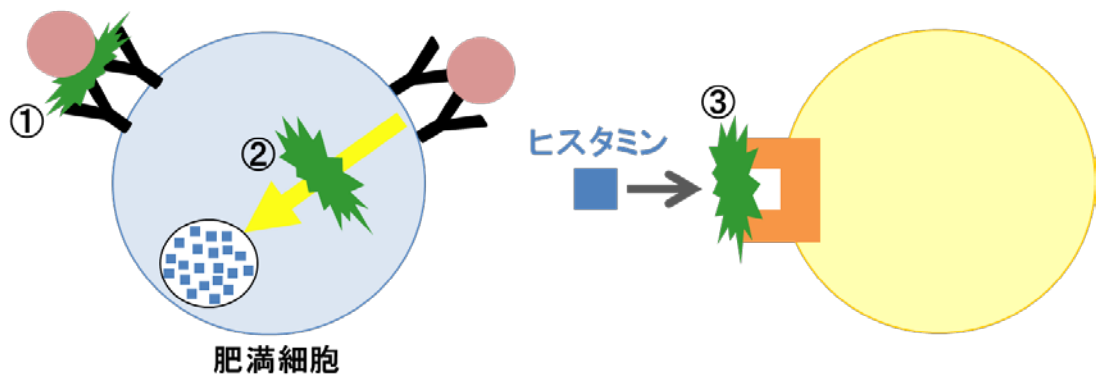


Fig.20 抗アレルギー成分の作用点

第六章 総合考察

本研究は、プチヴェールに含まれる機能性成分の解析を目的に、機能性成分の量や組成、調理や加工が機能性成分に与える影響、機能性（抗アレルギー作用）について注目、検討した。

第二章では機能性成分の量や組成を解析するために、プチヴェールおよびその親野菜であるケール、メキャベツのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定した。また、HPLC を用いてプチヴェール、ケール、メキャベツの成分を分離し、含まれている成分の量や組成の違いについて比較、検討を行った。その結果、プチヴェールのラジカル捕捉活性および総ポリフェノール量についてはケールより少なく、メキャベツとほぼ同等程度含まれていることが明らかとなった。また、HPLC の分析では、プチヴェールの成分の含有比率はメキャベツに近いという結果が得られた。プチヴェールにはケール同様、食物繊維、鉄、ビタミン C などがバランスよく含まれているが、ラジカル捕捉活性や総ポリフェノール量に関しては、プチヴェールはケールよりも少なく、メキャベツとほぼ同等程度含まれており、含有比率もメキャベツに近いという結果が得られた。この違いは非常に興味深く、各野菜の形状の違いにより、このような結果がもたらされた可能性が考えられる。通常、ポリフェノールは植物の表皮細胞に多く含まれており、紫外線から植物を保護する。その含量は植物種や光強度の違いによって変動する⁶⁾ことから、主に植物体の葉の部分を利用とするケールでは、紫外線を受ける面積が大きいため総ポリフェノール量が多く、結球しているメキャベツや主に芽の部分を利用とするプチヴェールは、紫外線を受ける面積が小さいため、総ポリフェノール量が少なかったのではないかと考えられる。

第三章では調理操作による機能性成分への影響を解析するために、調理したプチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量を測定した。また、HPLC を用いて成分を分離し、含まれている成分の量や組成の違いについて比較、検討を行った。

その結果、茹で調理に比べて電子レンジ調理では、ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量の残存量が多かった。また、HPLC の分析では、生と電子レンジ調理では大きな差がなかったのに対して、茹で調理では全体的にピークが小さくなっており、成分の溶出が起きていると考えられた。さらに、電子レンジ調理では加熱時間を 3 分から 10 分にしても大きな差はなかったため、ポリフェノール化合物は熱に強いと考えられた。これらのことを総合すると、プチヴェールの機能性成分を摂取するためには、茹で調理よりも電子レンジ調理の方が優れていることが示唆された。

第四章では発酵、保温したプチヴェール粉碎液および乾燥粉末プチヴェールのラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量、総ビタミン C 量などを測定し、解析した。また、HPLC を用いて成分を分離し、含まれている成分の量や組成の違いについて比較、検討を行った。発酵実験において、ラジカル捕捉活性は発酵前から発酵 7 日目にかけて差はなかった。ポリフェノール量は発酵前から発酵 2 日目にかけて増加し、その後 4 日目にかけてさらに増加した。一方、ビタミン C 量は発酵前から発酵 2 日目にかけて減少した。また、HPLC の結果から、発酵によって成分組成に変化が起きている可能性が考えられた。保温実験において、ラジカル捕捉活性は保温 0 分から 240 分にかけて差はなかった。発酵前から発酵 7 日目にかけて差はなかった。総ポリフェノール量も 0 分から 30 分にかけては差がなかったが、30 分から 240 分にかけて僅かに増加した。35°C の保温によって、ラジカル捕捉活性、総ポリフェノール量ともに減少することはなかった。そのため、この加工方法はプチヴェールの機能性成分を失活させない可能性が考えられる。また、HPLC の結果から、35°C の保温はプチヴェールの成分に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。乾燥粉末プチヴェールの分析において、乾燥粉末プチヴェールは生プチヴェールと同様に、ラジカル捕捉活性があり、ポリフェノール化合物を含有していた。HPLC による成分の分離結果では、生と乾燥粉末では成分の量や組成に違いがある可能性が考えられた。これらのことから、乾燥粉末プチヴェールを利用したパンや麺などの食品を積極的に利用することは、抗酸化成分の摂取量の増大に繋がると考えられる。また、抽出条件の違いによる乾燥粉末プ

チヴェールの成分の比較では、ラジカル捕捉活性に差は見られなかったが、総ポリフェノール量は常温抽出と比較して、60、100℃抽出で低下していた。HPLCによる成分の分離結果では、100℃抽出でピークの減少が観察された。これらの結果をまとめると、乾燥粉末プチヴェールの場合、高温での抽出は成分の分解を引き起こすと考えられる。しかしながら、総ポリフェノール量の減少が観察された60、100℃抽出でも、それぞれ常温抽出の88%、85%にあたる総ポリフェノール量が残存していた。そのため、乾燥粉末プチヴェールを利用した麺などの加工食品を加熱調理した場合も、ポリフェノール化合物は摂取できると考えられる。

第五章では細胞および動物実験を通してプチヴェールの機能性（抗アレルギー作用）を解析した。細胞実験ではRBL-2H3 cellにプチヴェール抽出濃縮液を添加し、脱顆粒抑制効果を調べた。その結果、プチヴェールにRBL-2H3 cellの脱顆粒を抑制する成分が含まれていることが明らかとなった。しかし、その成分は特定できておらず、ポリフェノール化合物の一種である可能性が考えられた。動物実験ではマウスにプチヴェール抽出液を経口投与した後、アレルギーを誘導し、耳介浮腫抑制効果を調べた。その結果、プチヴェールにはマウスの耳介浮腫を抑制する成分が含まれていることが明らかとなった。抗アレルギー作用を有する成分は特定できていないが、脱顆粒を抑制する性質をもつ物質である可能性や抗ヒスタミン薬であるシプロヘプタジンと同じような性質をもつ物質である可能性が示唆された。

以上のことから、プチヴェールは他のアブラナ科植物と同様に抗酸化成分（ポリフェノール化合物）を含んでおり、それらの成分は調理において茹で調理よりも電子レンジ調理で残存量が多く、発酵や保温などの加工を加えた場合も維持されていた。さらに、乾燥粉末プチヴェールにも生と同様に抗酸化成分（ポリフェノール）が含まれていた。そのため、プチヴェールや乾燥粉末プチヴェールを利用した加工食品を積極的に摂取することは、機能性成分の摂取量増大に繋がる可能性が考えられる。また、プチヴェールは抗アレルギー成分を含有している可能性が示唆された。そのため、プチヴェールを摂取することは、ア

アレルギー症状の抑制にも繋がる可能性が考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健社会統計課 (2014/9/11), 平成 25 年(2013) 人口動態統計 (確定数) の概況, http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei13/dl/00_all.pdf, (2015/1/7)
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・社会統計課 (2014/10/8), 平成 24 年度 国民医療費の概況, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/12/dl/data.pdf>, (2015/1/7)
- 3) Watanabe, T., Food and Disease: The Etiological Background of So-called Lifestyle-related Diseases, *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, **57**, 15-19 (2004)
- 4) 山田耕路, 食品のはたらきとその活用, *化学と生物*, **50**, 853 (2012)
- 5) 大澤俊彦, 「機能性成分」の現状, *化学と生物*, **44**, 406-412 (2006)
- 6) Igarashi, K., Investigations of Phytochemicals, Polyphenols and Development of Their Physiological Functions, *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, **64**, 127-135 (2011)
- 7) 吉田隆志, 有井雅幸, 波多野力, 津志田藤二郎, 室田佳恵子, 寺尾純二, 大澤俊彦, 金沢和樹, 松下佐織, 小幡明雄, 下田博司, 小野木宏, 加藤郁之進, 米谷俊, 南利子, 飯田純久, 田中一平, 松本均, 花村高行, 青木仁史, 南条文雄, 福井裕子, 金森拓也, 小野佳子, 小椋栄一郎, 山口典男, 市川剛士, 牧浦啓輔, 井上翔太郎, 田頭泰行, 神田智正, 庄司俊彦, 池口主弥, 越阪部奈緒美, 藤井創, 木下喜夫, 福田寿之, 野原哲也, 高下崇, フラボンおよびカルコン, フラボノール, フラバノン, イソフラボン, アントシアニン, フラバン-3-オール (カテキン類), カフェー酸誘導体および関連ポリフェノール, ジアリールヘプタノイド, プロアントシアニン類 (縮合型タンニン類), エラグ酸, エラジタンニン, ガロタンニン, 「植物ポリフェノール含有素材の開発 - その機能性と安全性 - Development of Polyphenol-rich Functional Foods」, 島 健太郎編, シーエムシー出版, 東京, pp.81-324 (2007)
- 8) Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., USDA Database for the Flavonoid Content of

- Selected Foods Release 3.1, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, pp.66,
(2013) <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav3-1.pdf>
- 9) 沼津市農業振興推進協議会, http://www.wbs.ne.jp/bt/noushinkyotokusan/s_puchi.htm
(2014/08/25)
- 10) 文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会, 「日本食品標準成分表 2010」, 全国官
報販売協同組合, 東京, pp.80-81, pp.102-103 (2010)
- 11) 東敬子, 室田佳恵子, 寺尾純二, 野菜フラボノイドの生体利用性と抗酸化活性, ビタミ
ン, **80**, 403-410 (2006)
- 12) 田中敏郎, 平野亭, 比嘉慎二, 有光潤介, 河合麻理, アレルギーとフラボノイド, 日本
補完代替医療学会誌, **3**, 1-8 (2006)
- 13) 西田浩志, 栗山由加, 川上賀代子, 武井裕輔, 千葉貴裕, 増田秀美, 風間克寿, 大塚彰,
佐藤眞治, 小西徹也, 高脂肪食給与マウスにおける新野菜プチヴェールの抗肥満作用.
日本栄養・食料学会誌, **64**, 169-175 (2011)
- 14) 星野香織, 穂山浩, 合田幸広, 谷村顕雄, 豊田正武, 3種 in vitro 試験法による 10 種野菜
抽出液の抗アレルギー活性評価について, 食品衛生学雑誌, **39**, 72-77 (1998)
- 15) Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Effect of thermal treatment on
radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds, *J. Food Sci.*, **69**,
7-10 (2004)
- 16) 津志田藤二郎, ポリフェノールの分析法, 「食品機能研究法」, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上
野川修一編, 光琳, 日本, pp.318-322 (2000)
- 17) Alet, V., Elizabeth, J., Dalene, B., Characterisation of Phenolic Compounds in South African
Plum Fruits (*Prunus salicina* Lindl.) using HPLC Coupled with Diode-Array, Fluorescence,
Mass Spectrometry and On-Line Antioxidant Detection, *Molecules*, **18**, 5072-5090 (2013)
- 18) 趙習コウ, 李進才, 松井鑄一郎, 前澤思禮, 近紫外線がラン葉の抗酸化機能の応答性に
及ぼす影響, 植物環境工学(*J. SHITA*), **17**, 192-198 (2005)

- 19) Yamaguchi, T., Oda, T., Katsuda, M., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Kanazawa, K., Takamura, H., Matoba, T., Changes in radical-scavenging activity of vegetables during different thermal cooking processes, *J. Cook. Sci. Jpn.*, **40**, 127-137 (2007)
- 20) Ioku, K., Aoyama, Y., Tokuno, A., Terao, J., Nakatani, N., Takei, Y., Various Cooking Methods and the Flavonoid Content in Onion, *J Nutr Sci Vitaminol*, **47**, 78-83 (2001)
- 21) Zhang, J.J., Ji, R., Hu, Y.Q., Chen, J.C., Ye, X.Q., Effect of three methods on nutrient components and antioxidant capacities of bamboo shoot (*Phyllostachys praecox* C.D. Chu et C.S. Chao), *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, **12**, 752-759 (2011),
- 22) Aoyama, S., Yamamoto, Y., Antioxidative Activity of Red Welsh Onion and the Effect of a Thermal Treatment, *J. Cook. Sci. Jpn.*, **39**, 283-288 (2006)
- 23) Sako, F., Mori, E., Katsuta, K., Changes in Vitamin C and Chlorophyll Contents in three Chinese Vegetables by Various Cooking, *J. Cook. Sci., Jpn.*, **29**, 39-44 (1996)
- 24) Hayashi, H., Fundamental Examination on Cooking Stability of Vitamin C in Foods, *J. Cook. Sci. Jpn.*, **26**, 12-26 (1993)
- 25) 松熊祥子, 大野智弘, 青木良子, 新田尚, 玉谷卓也, 小野稔, ケールの肥満細胞脱顆粒抑制作用について, 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2005)
- 26) Segawa, S., Yasui, K., Takata, Y., Kurihara, T., Kaneda, H., Watara, J., Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus Lupulus* L.) as Inhibitors of Chemical Mediator Release from Human Basophilic KU812 Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2990-2997 (2006)
- 27) 斉藤博久, アレルギー疾患発症のメカニズムとその予防, *化学と生物*, **48**, 326-330 (2010)
- 28) 八巻幸二, アレルギー性炎症反応を調節する食品成分, *日本食品科学工学会誌*, **50**, 295-301 (2003)

- 29) 金子裕隆, 川村博幸, 熊谷武久, 渡辺紀之, 亀山眞由美, 吉田充, 新本洋士, ラット白血病細胞 RBL-2H3 に対するイネポリフェノールの脱顆粒阻害作用, 日本食品科学工学会誌, **53**, 416-422 (2006)
- 30) 堀籠悟, 吉田泉, 玉木千恵, 山口明弘, 木船信行, 神部武重, 渡井正俊, RBL-2H3 細胞を用いた食品成分の脱顆粒抑制作用簡易スクリーニング法, 日本食品科学工学会誌, **55**, 535-540 (2008)
- 31) Morimoto, Y., Yasuhara, T., Sugimoto, A., Inoue, A., Hide, I., Akiyama, M., Nakata, Y., Anti-allergic Substances Contained in the Pollen of *Cyptomeria japonica* Possess Diverse Effects on the Degranulation of RBL-2H3 Cells. *J Pharmacol Sci* **92**, 291-295 (2003)
- 32) 上野川修一, 石川博通, 清野宏, 河野陽一, 清水誠, 下条直樹, 田之倉優, 戸塚護, 南野昌信, 八村敏志, 細野朗, 三浦総一郎, 山本佳弘, ポリフェノール, 「食品免疫・アレルギー辞典」, 日本食品免疫学会編, 朝倉書店, 東京, 358-375 (2011)
- 33) Yamamoto, T., Yoshimura, M., Yamaguchi, F., Kouchi, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Kikuchi, M., Anti-allergic Activity of Naringenin Chalcone from a Tomato Skin Extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1706-1711 (2004)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導ならびにご鞭撻を賜り、見守り続けて頂いた和泉秀彦教授に厚くお礼申し上げます。また、研究における姿勢、実験操作の指導や考察、そして本論文の作成に際して丁寧かつ厳しくご指導を下さった山田千佳子講師に心から感謝致します。

本論文の査読をして頂いた小原章裕教授、池田彩子教授、岸本満教授には大変貴重なご意見を頂き、深く感謝しております。

また、本研究のためにプチヴェールやケールを提供して下さいました JA あいち尾東の方々に感謝致します。

そして、今まで共に実験を行った食品学研究室の皆さんにも深く感謝いたします。

最後に、精神的、経済的に研究生活を支えてくれた両親に深い感謝の意を表します。